



Molecular characterization of pathogenic bacteria by pulsed field-gel electrophoresis (PFGE)

Caracterización molecular de bacterias patógenas mediante electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE)

Gaspar Morales-Romero^{1*}, Paulina Fabiola Rodríguez-Flores², Aida Bejar-Ubaldo², Irving Eduardo Jácome-Galarza³, Juan Luis Jaime Sánchez³, Gloria Alicia Figueroa-Aguilar³, Juan José Valdez-Alarcón¹.

¹Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.

²Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán; ³Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán.

gmr_0123@hotmail.com

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.2.48>

ABSTRACT

The growing need for surveillance of re-emerging infectious diseases necessitates the application of molecular characterization methods such as Pulsed-Field Gel Electrophoresis -PFGE. In the first collection, analysis macrorestriction *S. aureus* reveals a medium frequency (0.54) of pulsetype II, compared to the second collection where increased genetic heterogeneity exists. *S. enterica* presented some identical pulsotypes and other pulsotypes presented a genetic diversity (DI = 0.95), which suggests that there is epidemiological unrelated, with pulsetypes to particles serotypes. In addition, this study will help us create our database according to the PulseNet International Center for Disease Control and Prevention (CDC, USA).

Keywords: infections, Electrophoresis, Epidemiology, Pulse-types.

RESUMEN

La creciente necesidad de vigilancia de las enfermedades infecciosas re-emergentes hace necesario la aplicación de métodos moleculares de caracterización como la Electroforesis en Gel de Campos Pulsados-PFGE. En la primera colecta, el análisis de macrorrestricción de *S. aureus* revela una frecuencia media (0.54) del pulstipo II, en comparación a la segunda colecta donde se observa una mayor heterogeneidad genética. *S. enterica* presentó algunos pulstipos idénticos y otros pulstipos presentaron una diversidad genética (ID=0.95), lo que nos sugiere, que no existe una relación epidemiológica con pulstipos o serotipos particulares. Además, este estudio nos ayudara a crear nuestra base de datos de acuerdo a la PulseNet International del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA).

Palabras clave: Infecciones, Electroforesis, Epidemiología, Pulso-tipos.

1. INTRODUCCIÓN

La reemergencia de las enfermedades infecciosas transmitidas por bacterias, se ha incrementado en los últimos años en el mundo, debido a los cambios realizados en los ecosistemas, así como un generalizado e inadecuado uso de los antibióticos; esto permite que el genoma bacteriano este bajo continúa modificación por la presión selectiva del ambiente, favoreciendo la diseminación de patógenos que causan graves enfermedades infecciosas de gran trascendencia en la salud pública (Karchmer, 2006; Rubin, 2002). La epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas ha avanzado en las últimas dos décadas con numerosas herramientas de la biología molecular; esto representa un avance revolucionario en los conocimientos y conceptos en esta disciplina, ya que los sistemas de caracterización molecular permiten reconocer características genéticas de las poblaciones bacterianas que no son reveladas por las técnicas de laboratorio convencionales (Levin *et al.*, 1999; Riley, 2004). Un amplio número de métodos y técnicas de caracterización molecular han sido descritos y empleados para la diferenciación de bacterias patógenas, y la aplicación de estos métodos moleculares genera una eficiencia en el diagnóstico y caracterización de bacterias patógenas. En cuanto, a las estrategias basadas en el análisis de la estructura del genoma, la secuenciación del genoma y el análisis de patrones de restricción de ADN cromosomal por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados-*Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE por sus siglas en ingles), son las de mayor poder de discriminación entre aislados. La secuenciación del genoma por su costo no puede ser utilizada en estudios epidemiológicos amplios, por lo tanto, PFGE ha sido considerado como el estándar de oro entre los métodos de caracterización molecular por poseer una alta reproducibilidad y un alto poder de discriminación. Además, es el primer método de elección en los laboratorios de PulseNet International, para la vigilancia e investigación de brotes epidemiológicos de bacterias patógenas clínicamente importantes (Lukinmaa *et al.*, 2004; Murchan *et al.*, 2003; Valdez *et al.*, 2015; Sabat *et al.*, 2013; Sandt *et al.*, 2006; Murase *et al.* 2004). La electroforesis de ADN convencional es una técnica extraordinariamente simple: un campo eléctrico constante es aplicado a través de una placa de gel de agarosa y las moléculas de ADN pequeñas son tamizadas y migran en una forma dependiente del tamaño, pero el efecto de tamizado y de separación falla cuando moléculas de ADN de mayor tamaño deben ser resueltas. En 1983, Schwartz y Cantor desarrollaron el PFGE como un método para evitar estas limitaciones, permitiendo el fraccionamiento de grandes moléculas de ADN en millones de pares de bases utilizando endonucleasas de restricción, de esta forma separando las moléculas de ADN con una mayor resolución que la electroforesis convencional [Fig. 1] (Fangman, 1978, Schwartz *et al.*, 1984).

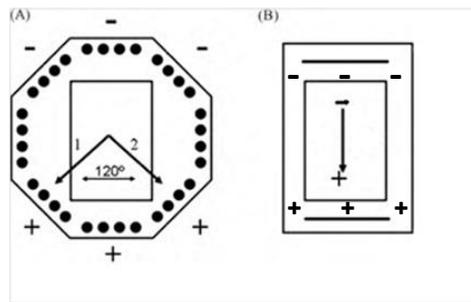


Fig. 1. Representación esquemática que ilustra la diferencia entre la instrumentación utilizada por PFGE (A) vs electroforesis convencional (B). Tomada y modificada de Goering 2010.

El PFGE favorece el tamizado molecular debido al “zigzag” del ADN en respuesta a cambios periódicos en la orientación del campo eléctrico. La movilidad electroforética depende fuertemente de los tiempos de los pulsos (duración del campo aplicado) y de la naturaleza de los campos aplicados (Fangman, 1978; Goering, 2010; Schwartz *et al.*, 1984). El PFGE es realizado en un gel de agarosa en el cual la orientación del campo eléctrico es aplicado primero en una dirección (Norte/Sur). Después el campo eléctrico se cambia a una segunda dirección (Este/Oeste) en un corto periodo de tiempo (un pulso); estos cambios de dirección permiten que los fragmentos de ADN, se resuelvan en patrones de bandas en el gel, y estos patrones de bandas pueden ser comparados entre sí para determinar la diversidad genética de los aislados bacterianos. En la comparación de los patrones de bandas se pueden detectar cambios genéticos, como mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y la pérdida o adquisición de plásmidos, que podrían explicar las diferencias mínimas en los patrones de bandas entre los aislados. Estos cambios se dan generalmente en dos o tres fragmentos diferentes en los patrones de bandas de PFGE, como el estudio demostrado por Thal *et al.*, en la inserción del transposón Tn916 (16 kb) que confiere resistencia a tetraciclina en *Enterococcus faecalis* (Birren, *et al* 1993; Murchan *et al.*, 2003; Lukinmaa *et al.*, 2004; Ribot, *et al.*, 2006; Tenover *et al.*, 1995; Thal *et al.* 1997). El objetivo de este estudio, es utilizar el PFGE para la caracterización molecular de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*. Eso nos permitirá realizar análisis de la diversidad genética, con el fin de poseer la relación epidemiológica y la relación genética de estos aislados. Así, como demostrar el papel esencial que juega el PFGE en la vigilancia epidemiológica y recopilar la información relevante de las cepas predominantes en brotes infecciosos en el estado de Michoacán; los cuales serán relevantes para la comparación de la base de datos que establece y gestiona PulseNet International del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo y cepas

Staphylococcus aureus. La colecta se realizó en el municipio de Tarímbaro, Michoacán; en las localidades de Cotzio y Tájaro, las cuales presentan un clima templado con lluvias en verano, con una humedad promedio de 56.6%, temperatura promedio anual de 17.7°C, y forma parte de una de las cuencas lecheras importantes que proveen de leche a la capital del Estado. La investigación comprende de un estudio observacional transversal en dos

periodos, 2003-2004 y 2008. Se analizaron 15 aislados obtenidos en 2003-2004 y 12 aislados del 2008; además se analizaron 2 cepas de referencia utilizadas en este estudio; las cepas de referencia son *S. aureus* ATCC 27543 (American Type Culture Collection) aislada de un caso de mastitis en bovinos y *S. aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Culture) aislada de un caso de una úlcera corneal-conjuntival en humano.

Salmonella enterica. El Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Michoacán cuenta con una colección de 79 aislados obtenidos de muestras de alimentos, las cuales se encuentran serotipificadas por el esquema de Kauffmann-White. La cepa de referencia utilizada como marcador de peso molecular universal, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Braenderup H9812.

2.2 Protocolo PFGE

Las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron inoculadas en 5 mL de Medio Luria-Bertani y se incubaron durante toda la noche a 37° C con agitación constante. La densidad óptica bacteriana se ajustó por regla del Nefelómetro de McFarland a $\lambda=620$ nm a una absorbancia de 0.50-0.55 en el espectrofotómetro (SmartSpec Plus BioRad). Para obtener las cantidades en microlitros (μ L) del cultivo bacteriano a utilizar, se toman 350 μ L y se resuspenden con 650 μ L de Caldo Soya Trypticaseína, para obtener la Absorbancia de 0.53. Las cantidades de cultivo bacteriano determinadas por ajuste con el Nefelómetro de McFarland Se depositaron en un tubo de 1.5 mL. Se agregaron 500 μ L de amortiguador PIV (Tris-HCl, 10 mM; NaCl, 1 M, pH 7.6). Se centrifugó por 5 minutos a 13000 r.p.m., y el sobrenadante se decantó; posteriormente se adicionaron 150 μ L de amortiguador PIV y la suspensión bacteriana se conservó a 50° C en baño maría. La agarosa de bajo punto de fusión se preparó al 3% en amortiguador TE_{10/1} (Tris-HCl, 10mM; EDTA, 1mM, pH 7.5) y la suspensión bacteriana se mezcló con un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión. La mezcla se depositó en los moldes para formar los bloques; Se depositaron 500 μ L de amortiguador de Lisis Celular (Tris-HCl, 1.0 M; NaCl, 1.0 M; EDTA, 100 mM; Brij 58, 0.5%; N-lauril sarcosinato de sodio 0.5%; Ribonucleasa A, 50 mg; lisozima, 1 g; lisostafina, 50 μ g/mL [pH 7.6]) a cada tubo; se incubó a 37° C durante toda la noche. Luego, se retiró el amortiguador de Lisis Celular y se depositaron 500 μ L de amortiguador ESP (EDTA, 0.4 M; N-lauril sarcosinato de sodio, 1% y Proteinasa K 500 mg/mL [pH 9.0]); y se incubó a 50-55° C durante toda la noche en baño de agua de temperatura controlada. El amortiguador ESP se retiró. Posteriormente los bloques se transfieren a tubos cónicos con 10 mL de amortiguador TE para sus lavados; se incubaron por 1 hora a 40° C en baño de agua de temperatura controlada. El amortiguador TE se retiró por decantación; y se depositaron nuevamente 10 mL de amortiguador TE. Los lavados de los bloques se repitieron por cinco veces. La macro-restricción con enzima *Sma* I se realizó con 177 μ L de agua destilada estéril, 20 μ L de amortiguador de enzima *Sma* I, y 3 μ L de enzima *Sma* I (Promega) por bloque (50 U); y se incubó a temperatura recomendada por el fabricante durante toda la noche. Se prepararon 150 mL del gel de corrida al 1% en amortiguador TBE 0.5x., Posteriormente los bloques fueron colocados en el gel y sellados para su corrida electroforética en el sistema Gene Navigator System (Amersham Biosciences). El tiempo total de corrida fue de 20 horas; con los pulsos N/S- 5.3 seg; E/O- 5.3 seg. las primeras 12 hrs.; y con los pulsos N/S- 34.9 seg. E/O- 34.9 seglas restantes 8 hrs a un Voltaje continuo de 210 Volts.

3. RESULTADOS

En este trabajo se analizaron aislados de *S. aureus* y *S. enterica* mediante electroforesis en gel de campos pulsados utilizando las enzimas de restricción *Sma* I y *Xba* I respectivamente; resultando en 44 patrones de restricción distinguibles, de los cuales 28 patrones son para *S. aureus* y 16 patrones para *S. enterica*. Estos patrones de bandas revelan diferencias por la diversidad genética de los aislados. Además, considerando que los datos e información de las macrorestricciones nos permiten reconocer la heterogeneidad genética de los aislados y así detectar estos, en brotes epidemiológicos (Tenover *et al.*, 1995).

3.1 Macro-restricción de *S. aureus*

En la macrorestricción que se realizó para *S. aureus*, se observó que en un corto periodo de diseminación (4 años) hubo un cambio genético de las cepas predominantes en la misma área geográfica. Como se reflejó en el primer periodo de colecta del año 2004 (Figura 2A), con los aislados del segundo periodo de colecta de 2008 (Figura 2B), señalado en diferentes tiempos y en las mismas áreas geográficas. Las imágenes de macrorestricción de *S. aureus*, resaltan una frecuencia relativa media (0.54-pulsotipo **II**) de los aislados de la primera colecta, ya que proporcionan patrones de bandas o pulso-tipos idénticos, respecto a la segunda colecta que poseen una mayor heterogeneidad genética (Figura 2). Lo anterior implica una variación genotípica de los aislados de *S. aureus* en diferentes tiempos de colecta y en la misma área geográfica estudiada.

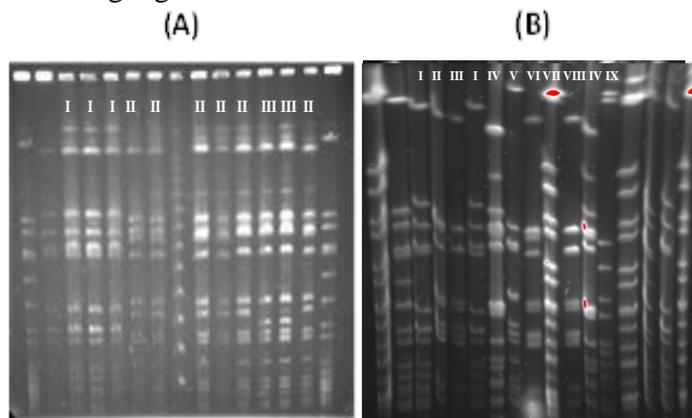


Fig. 2. Patrones de macrorestricción por PFGE de *S. aureus*. (A) Aislados de *S. aureus*, macrorestricción de cepas por PFGE de la primer colecta del 2004, en donde se observó una prevalencia del mismo pulsotipo (II). (B) Aislados de *S. aureus* 2008 por PFGE, se observan diversos pulsotipos.

3.2 Macro-restricción de *S. enterica*

En la segunda macrorestricción con cepas de *S. enterica*, (Figura 3), se observó la diversidad genotípica de 21 pulsotipos diferentes en 15 serotipos de *S. enterica* analizados. Al distinguir estos serotipos, nos permitió analizar su relación epidemiológica entre los aislados que generaron idénticos o diferentes pulsotipos de *S. enterica*; como el caso de los

serotipos *Salmonella* Antígeno Flagelar Rugoso y *Salmonella* Anatum (Fig.3A. Carril 4-5), que presentan un pulsotipo idéntico, esto sugiere que comparten el mismo fondo genético. En otros casos los pulsotipos de los aislados de *S. enterica* serovar Javiana (Fig.3B. Carril 4,6-7) no se diferenciaron utilizando PFGE, por la restricción total o degradación del ADN genómico probablemente debido a la presencia de ADNasas, señalando a *S. enterica* serovar Javiana como no tipificable por PFGE. Las cepas en las que los patrones o pulsotipos diferentes corresponden a los diferentes serotipos *Salmonella* Agona, Meleagridis, E1, Antígeno Flagelar Rugoso, Anatum, Sinstorf, Javiana, Urbana, Typhimurium, London, Give, Enteritidis, Montevideo, Braenderup y Braenderup H9812 respectivamente (Ribot *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2006; Murase *et al.*, 2004). El análisis de macrorestricción en PFGE presentó un índice de discriminación mayor (D=0.95), superior al de la serotipificación (D=0.86).

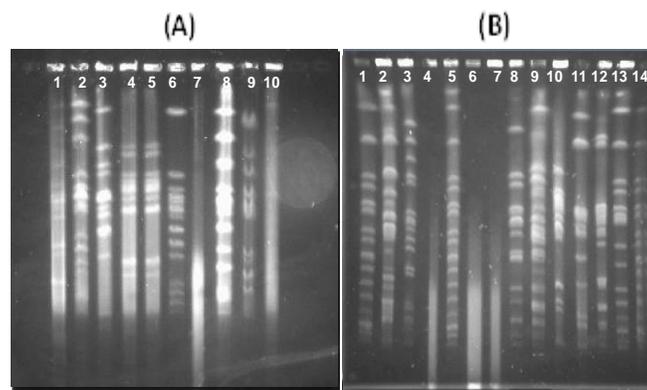


Figura 3. Patrones de macrorestricción por PFGE de *S. enterica*. (A) Se observa los patrones de bandas o pulsotipos de los serotipos *Salmonella*: carril-1. Agona; 2. Meleagridis; 3. E1; 4. Antígeno Flagelar Rugoso; 5. Anatum; 6. Sinstorf; 7. Javiana; 8. Urbana; 9. Typhimurium; 10. London, respectivamente. (B) Se observa pulsotipos de los serotipos en los carriles: 1,5,14. Braenderup H9812; 2,9. Typhimurium; 3. London; 4,6,7. Javiana; 8. Give; 10. Agona; 11. Enteritidis; 12. Montevideo y 13. Braenderup; en donde los pulsotipos indistinguibles pertenecen del serotipo *S. Javiana* en los carriles 7(A)-4,6 y 7(B).

4. DISCUSIONES

En este trabajo se evaluó la diversidad genética de los aislados de *S. aureus* y *S. enterica* mediante el método de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), que es una técnica de análisis epidemiológico de alto poder de discriminación. En estos análisis se demostró que en un corto periodo de diseminación, se realizó un cambio en las cepas predominantes en la misma área geográfica de los aislados de *S. aureus*. Además, el pulsotipo II, fue el más predominante o frecuente en el primer periodo de colecta, en comparación del segundo periodo de colecta que existe una mayor heterogeneidad genética, ya que no existe un pulsotipo predominante. Lo anterior sugiere la importación de nuevos linajes genéticos en nuestra región (Blanc, *et al.*, 2007; Murchan *et al.*, 2003; Prevost *et al.*, 1992). Esto es congruente con el modelo de granja familiar donde se colectaron las muestras, donde las necesidades económicas rigen los movimientos de compra-venta de animales.

En los aislados analizados de *S. enterica* por PFGE, se discriminaron 21 pulsotipos diferentes entre 24 aislados de *S. enterica* (88% de aislados discriminados), proporcionando un índice de discriminación ($D=0.95$), este nivel de discriminación señala a los serotipos como aislados no relacionados epidemiológicamente, esto por poseer una heterogeneidad genética. Además, en la Fig. 3A. Carriles 4 y 5, se observaron serotipos que poseen idéntico pulsotipo, lo cual pueden señalarse como aislados relacionados epidemiológicamente o aislados con una relación genética, como es el caso de los serotipos señalados anteriormente *S. Antígeno Flagelar Rugoso* y *S. Anatum*. Lo anterior probablemente se debe al laborioso procedimiento de serotipificación o que puede conducir a errores en la identificación. En otro caso, el serotipo *S. Javiana* no proporciono un pulsotipo visible o distinguible, probablemente por la degradación del ADN, debido a ADNasas; aparte de la degradación del ADN, la metilación de ADN genómico, es debido a que la actividad enzimática de *Xba I*, es bloqueada por Metilasas en las secuencias de reconocimiento. (Tenover, *et al.*, 2006; Ribot, *et al.*, 2006; Murase *et al.*, 2004; Fendri *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2006).

En conclusión, el método de caracterización molecular como la electroforesis en gel de campos pulsados fue esencial para la discriminación de bacterias patógenas como *S. aureus*; ya que nos permitió discriminar aislados. Se sugiere una relación epidemiológica con el pulsotipo II en el primer periodo de colecta por sus pulsotipos idénticos en comparación con el segundo periodo de colecta, que no poseen relación epidemiológica por poseer heterogeneidad genética o pulsotipos diferentes. También, es posible no solo con la identificación de cepas sino también con el seguimiento de la predominancia de los genotipos más relevantes, establecer su relación clonal (semejanzas genéticas) y la transferencia en interespecies de los genes de virulencia que confieren las características patogénicas. En el caso de *Salmonella*, la discriminación de los serotipos por PFGE constituye una herramienta de mucha utilidad para estudios epidemiológicos, ya que se podrían asociar los pulsotipos con los serotipos, y de esta manera sustituir el laborioso método serológico, que implica contar más de 250 antisueros para la identificación de 2600 serotipos y a su vez reducir costos y tiempos en la discriminación de los serotipos. Por ello y dado que el índice de discriminación (D) fue superior para el PFGE en comparación con la serotipificación, se plantea utilizar el PFGE por ser más sensible y menos laborioso, como una herramienta para la reducción y sustitución de la serotipificación, como un método estándar de caracterización de *Salmonella*, para lo cual es necesario seguir ampliando nuestra base de datos para realizar la comparación con la base de datos de PulseNet International del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA).

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Coordinación de Investigación Científica-CIC (proyecto 14.7) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al CONACYT-Fondos Mixtos del Estado de Michoacán (proyecto MICH-2012-C05-196879) por su apoyo para la realización de este trabajo. También agradecemos al Departamento de Bacteriología y al Departamento de Alimentos del Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Michoacán por haber proporcionado la información de los serotipos de *Salmonella enterica*, y al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz por haber proporcionado la cepa de *Salmonella* Braenderup H9812 para los estudios de PFGE de *Salmonella enterica*.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Birren, B., Lai, E., 1993. Pulsed Field Gel Electrophoresis a Practical Guide. Academic Press, San Diego.

Blanc, D. S. C. Petignat, A. Wenger, G. Kuhn, Y. Vallet, D. Fracheboud, S. Trachsel, M. Reymond *et al.*. 2007. Changing Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Small Geographic Area Over an Eight-Year Period. *J. Clin. Microbiol.*; 45: 3729 - 3736.

Fangman, W.L. 1978. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 5:653–665.

Fendri I, Ben Hassena A, Grosset N, Barkallah M, Khannous L, *et al.* (2013) Genetic Diversity of Food-Isolated *Salmonella* Strains through Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR). *PLoS ONE* 8(12): e81315.

Goering RV. 2010. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.*10(7):866-75.

Karchmer, A.W. 2006. From theory to practice: resistance in *Staphylococcus aureus* and new treatments. *Clin.Microbiol. Infect.* 12(8):15-21.

Levin, B., Lipsitch, M., Bonhoeffer, S. 1999. Population Biology, Evolution, and Infectious Disease: Convergence and Synthesis. *Science.* 283:806-809

Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M & Siitonen A (2004) Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of foodborne bacterial pathogens. *APMIS* 112: 908–927

Murase, T., Nagato, M., Shirota, K., Katoh, H., & Otsuki, K. (2004). Pulsed-field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. *Veterinary microbiology*, 99(2), 139-143.

Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, *et al.* 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol.*41(4):1574-85.

- Prevost, G., Jaulhac, B., Piemont, Y. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30:967-973.
- Ribot, E., Fair, M., Gautom, D., Cameron, S., Hunter, B., *et al.* 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 3:59–67
- Rubin, M. A., Samore, M. H. 2002. Antimicrobial Use and Resistance. *Curr. Infect. Dis. Report.* 4:491-497.
- Riley, L.W. 2004. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Principles and Practices.* American Society for Microbiology. Washington, D.C. 348 pp.
- Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.
- Sandt, C. H., Krouse, D. A., Cook, C. R., Hackman, A. L., Chmielecki, W. A., Warren, N. G. (2006). The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multi-serotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania. *Journal of clinical microbiology*, 44(9), 3208-3212.
- Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., Van Dijl, J. M., Laurent, F. ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*, 18(4), 20380.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.
- Thal, L. A., Silverman, J., Donabedian, S., & Zervos, M. J. (1997). The effect of Tn916 insertions on contour-clamped homogeneous electrophoresis patterns of *Enterococcus faecalis*. *Journal of clinical microbiology*, 35(4), 969-972.
- Valdez –Alarcón, J.J., Bustos-Martinez. J.A., *et al.* 2015. *Staphylococcus aureus* asociado a la mastitis bovina: un enfoque epidemiológico-funcional: Producción y Calidad de la Leche. D.R. c . Juan Pablos Editor s.a. 300 pp.
- Wong, H., Kuo, C. (2006). An improved procedure for the pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Vibrio vulnificus*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 14(2), 215-217.