



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de
Producción y de la Salud Animal**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Epidemiología genómica de cepas de *Salmonella*
provenientes de nódulos linfáticos y carne molida de res.**

TESIS

Para optar por el grado de Maestro en Ciencias

Presenta:

P MC MVZ Elfrego Adrián Ponce Hernández

COMITÉ TUTORAL:

Dra. María Salud Rubio Lozano. FMVZ-UNAM

Dr. Enrique Jesús Delgado Suárez. FMVZ-UNAM

Dra. Ana María Sifuentes Rincón. CBG-IPN

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

Marzo del 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tabla de contenido

Índice de cuadros.....	I
Índice de figuras.....	II
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	IV
Abstrac.....	V
Introducción.....	1
I Antecedentes.....	3
I.a. Taxonomía del género <i>Salmonella</i>	3
I.b. <i>Salmonella</i> : contradicción evolutiva.....	4
I.c. Genoma conservado	7
I.d. Genoma adaptativo	9
I.e. Epidemiología de la salmonelosis. Tifoidea y no tifoidea.....	12
I.f. Diversidad y linajes genéticos de <i>Salmonella</i> en bovinos.....	16
II. Metodología.....	18
II.a Aislamiento de cepas de <i>Salmonella</i>	18
II.b Secuenciación de genoma de las cepas de <i>Salmonella</i>	18
II.c Obtención de genomas completos.....	19
II.d Pangenoma.....	20
II.e Análisis filogenéticos.....	20
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
III.a. Pangenoma indica presión evolutiva del nicho ecológico.....	22
III.a1 Genoma conservado.....	21
III.a2 Genoma adaptativo.....	21
III.a3 Funciones contenidas en los genomas.....	22
III.a4 Pangenoma y genoma conservado de cepas de <i>Salmonella enterica</i>	23

III.b Filogenia revela el aporte de <i>Salmonella</i> de nódulos linfáticos a carne molida...	24
III.c Filogenia muestra persistencia de cepas <i>Salmonella enterica</i> en diferentes fuentes.....	28
IV. Conclusiones.....	32
V. Anexos.....	33
VI. Referencias.....	40

Índice de cuadros

Cuadro 1. Agrupación serotipos de <i>Salmonella enterica</i> con base en su hospedero	3
Cuadro 2. Frecuencia de positividad a <i>Salmonella enterica</i> en diferentes matrices bovinas...	14
Cuadro 3. Procedencia de los genomas de cepas <i>Salmonella enterica</i> usados en el presente estudio...	21

Índice de figuras

Figura 1. Taxonomía del género <i>Salmonella</i> ...	3
Figura 2. Diagrama de genoma conservado del género y familias de genes de subespecies...	8
Figura 3. Genes conservados y accesorios distribuidos en grupos de genes ortólogos...	23
Figura 4. Pangenoma y genoma conservado...	24
Figura 5. Filogenia de 77 cepas de <i>Salmonella enterica</i> ...	30
Figura 6. Filogenia de 127 cepas de <i>Salmonella enterica</i> ...	31

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México y de forma muy especial a su Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por darme la oportunidad de realizar un sueño.

A mi asesora la Dra. María Salud Rubio Lozano por aceptarme, enseñarme la Ciencia de la Carne, por su amistad y su invaluable ayuda.

A mi comité tutor: Dra. Ana María Sifuentes Rincón y Dr. Enrique de Jesús Delgado Suárez, por su tiempo, paciencia, consejos e invaluable ayuda.

Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la FMVZ-UNAM.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Papiit) por la financiación de mi proyecto con número: IN212817

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

A todos los que de alguna manera contribuyeron a la culminación de este trabajo.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar la contribución epidemiológica de cepas de *Salmonella* asociada con nódulos linfáticos a la contaminación de la carne molida de res utilizando secuenciación completa del genoma y análisis filogenéticos. Para ello, se trabajó con 77 genomas de cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (SE) obtenidas de carne molida y linfonodos de canales de res comercializadas en CDMX. El primer análisis filogenético reveló que cepas obtenidas a partir de carne molida son genéticamente indiferenciables de aquellas que provinieron de nódulos linfáticos en serotipos como Anatum, Reading, London, Fresno y Kentucky que en conjunto representan 64 (83.12%) genomas de *Salmonella enterica*. Esto resalta el papel que juegan los nódulos linfáticos en la contaminación de la carne molida con cepas de *Salmonella* de importancia en la salud pública. En un segundo análisis filogenético se observa cercanía genética entre cepas de bovinos con cepas provenientes de casos clínicos en humanos, en todos los serotipos encontrados, lo cual refleja el papel de los bovinos como portadores de cepas de *Salmonella enterica* capaces de enfermar a los humanos.

Palabras clave: ***Salmonella*, filogenia, nódulos linfáticos, carne molida.**

Abstract

This study aimed to determine the epidemiological contribution of *Salmonella* strains associated with lymphatic nodules in the contamination of ground beef using whole-genome sequencing and phylogenetic analysis. To achieve this goal, we analyzed 77 genomes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strains isolated from both ground beef and lymphatic nodules from beef carcasses commercialized in Mexico City. The first phylogenetic analysis shows that the strains from ground beef were genetically indistinguishable from the strains from lymphatic nodules corresponding to serotypes Anatum, Reading, London, Fresno, and Kentucky; altogether, they represent 64 (83.12%) genomes of *Salmonella enterica*. This finding highlights the role of lymphatic nodules in *Salmonella*-associated contamination of ground beef with important implications for public health. In a second phylogenetic analysis of both, bovine strains and strains of different origins, we observed a close relationship between bovine strains and strains associated with human clinical cases, this shows the role of cattle as a reservoir of *Salmonella enterica* strains which may be able to develop the human disease.

Keywords: ***Salmonella*, phylogeny, lymphatic nodules, ground beef.**

Introducción

La salmonelosis transmitida por alimentos es una enfermedad causada por bacterias del género *Salmonella* spp. y es una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial (OMS, 2018 b). El Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos estima anualmente alrededor de 1.2 millones de enfermos afectados, 23,000 hospitalizaciones y 450 muertes por *Salmonella* spp. en ese país (CDC, 2018). Por su parte, Hoffmann *et al.* (2012) estiman que los costos de esta enfermedad representan 3.3 billones de dólares en Estados Unidos. En México, los reportes de la Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Salud a agosto del 2020 alcanzan cifras de más de 58,000 casos de salmonelosis.

El ganado bovino se presenta como un reservorio de *Salmonella*, la cual se ha logrado aislar de muestras provenientes de canales, heces y piel (Ayala *et al.*, 2017; Narvaez-Bravo *et al.*, 2013). Tales hallazgos, además, han determinado que la forma más común de contaminación ha sido la ruta fecal-oral. Por ello, se han desarrollado múltiples intervenciones para prevenir la contaminación de canales y carne con *Salmonella* presente en piel y heces (Castillo *et al.*, 1999). De estas, las que han demostrado una efectividad mayor en rastros son el proceso de lavado de canales con ácidos orgánicos y agua caliente a presión, la aplicación de vapor y los recortes de partes contaminadas con material fecal visible, ya que permiten alcanzar reducciones de entre 3 y 4 logaritmos en la concentración del patógeno (Castillo *et al.*, 1998; Kalchayanand *et al.*, 2009). Sin embargo, estas medidas son dirigidas a la superficie de las canales y no son eficaces para eliminar la contaminación procedente de otras fuentes, como los nódulos linfáticos, los cuales representan también un reservorio importante de *Salmonella* (Haneklaus *et al.*, 2012; Webb *et al.*, 2017).

Diversos estudios alrededor del mundo reportan diversos niveles de positividad a *Salmonella* en canales; 0.3% en Irlanda (Khen *et al.*, 2014), 0.1% en Canadá (Bohaychuk *et al.*, 2011), y en nuestro país aparecen cercanos al 15% (Pérez-Montaña *et al.*, 2012). Mientras que, en carne molida, los resultados suelen ser mayores, en China de 4.8% (Yin *et al.*, 2016), 3.0% en Irlanda (Khen *et al.*, 2014) y en México se ha reportado hasta un 56% (Cabrera *et al.*, 2013). Diferentes estudios sugieren que estas diferencias podrían explicarse por el hecho de que los nódulos linfáticos se suelen mezclar con los recortes de carne que se utilizan para la elaboración de la carne molida (Arthur *et al.*, 2008; Vohra *et al.*, 2018). Mediante un proceso de simulación estocástica,

Li *et al.*, (2015), atribuyen a los nódulos linfáticos el 90% de la contaminación con *Salmonella* que se registra en carne molida. De hecho, en un estudio realizado con ganado de desecho, se encontró clonalidad entre cepas de *Salmonella* provenientes de nódulos linfáticos, piel y otras fuentes. Tal hallazgo se realizó usando la prueba molecular de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) (Koochmaraie *et al.*, 2012). Sumado a lo anterior, la creciente disponibilidad de tecnologías para la secuenciación completa del genoma (SCG) permite realizar análisis filogenéticos de alta resolución (Ugolotti *et al.*, 2016), en contraste con el bajo poder discriminatorio de la PFGE. A pesar de todo esto, son escasos los estudios en ganado de engorda comercial que se apoyen en herramientas moleculares con alto poder de discriminación (Nguyen *et al.*, 2018; Bugarel *et al.*, 2019). Esta información facilita conocer la dinámica evolutiva de poblaciones de *Salmonella* que se encuentran circulando en animales aparentemente sanos, así como documentar, con alto grado de confiabilidad, la relación epidemiológica entre los aislamientos, para así identificar posibles fuentes de contaminación (Cao *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2018).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la contribución epidemiológica de *Salmonella* asociada con nódulos linfáticos a la contaminación de la carne molida de res utilizando secuenciación completa del genoma y análisis filogenéticos.

I. Antecedentes

I.a Taxonomía del género *Salmonella*

Actualmente las bacterias que componen el género *Salmonella* están divididas en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última a su vez, se divide en 6 subespecies (Figura 1). Tanto *Salmonella bongori* como las subespecies II, IIIa, IIIb, IV y VI de *Salmonella enterica*, rara vez son aisladas de muestras provenientes de casos clínicos y se encuentran más asociadas con animales de sangre fría y al medio ambiente. En contraste, más del 99.5% de las cepas de *Salmonella* que causan enfermedades en humanos y animales domésticos pertenecen a la subespecie de *Salmonella enterica*. Existen cepas llamadas salmonelas tifoideas, que comprenden a los serotipos Typhi, Paratyphi y Sendai y tienen como único hospedero al hombre; y también existen cepas llamadas comúnmente salmonelas no tifoideas (SNT), estas presentan un amplio rango de hospederos. Actualmente las SNT cuentan con más de 2,600 serotipos, por lo que juegan un papel más relevante en materia de salud pública (Grimont y Weill, 2007).

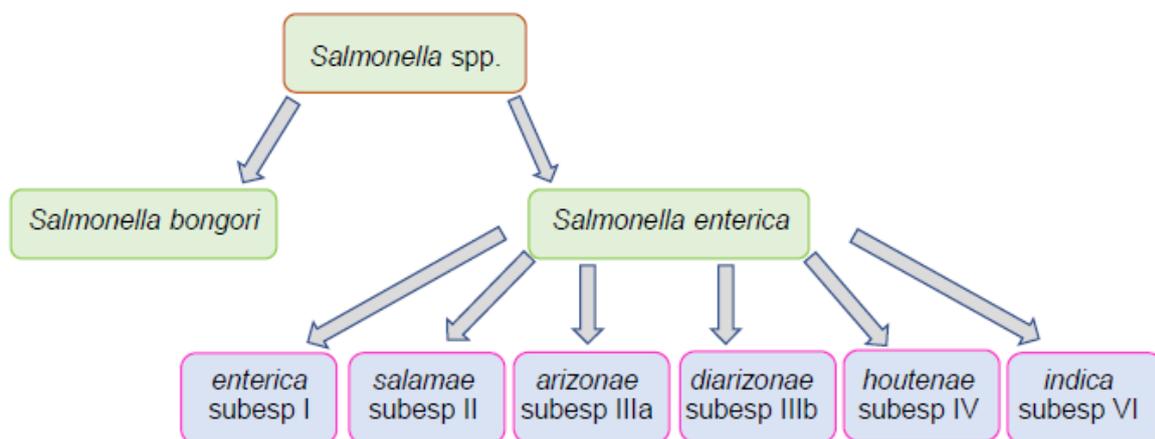


Figura 1. Taxonomía del género *Salmonella* (adaptado de Grimont y Weill, 2007)

La clasificación actual de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* está basada en la fórmula antigénica, que consiste en serotipificación de los antígenos presentes en la superficie de la bacteria y son divididos en antígenos O (somático) y H (flagelares). El antígeno O está constituido por los lipopolisacáridos que forman la membrana externa

de la bacteria y es codificado por el gen *rfb*. Mientras que el antígeno H es determinado por el sistema de flagelos que le proporcionan motilidad al patógeno, está dividido en fase 1 (codificado por el gen *fliC*) y fase 2 (codificado por el gen *fjiB*) (Grimont y Weill, 2007).

En algunos casos existe un tercer antígeno localizado en la superficie capsular bacteriana, denominado (K) que presenta un subtipo de antígeno relacionado con virulencia, comúnmente llamado Vi, y que se encuentra solamente en los serotipos Typhi, Paratyphi C y Dublin (Nataro *et al.*, 2003, García *et al.*, 1992, Winfield y Groisman, 2013).

La fórmula antigénica de cualquier serotipo de *Salmonella enterica* está compuesta por los antígenos O, seguido de los antígenos H fase 1 y fase 2; por ejemplo, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium es 1,4, [5],12:i:1,2. Esta cepa tiene los factores del antígeno O 1,4 [5] y 12 y los antígenos flagelar H i (primera fase) y el flagelar H 1 y 2 (segunda fase).

Sin embargo, históricamente, los serotipos de la subespecie *enterica* recibieron en lugar de fórmulas antigénicas, nombres, que evocan la enfermedad que provocaban (por ejemplo *S. enterica* serotipo Typhi o *S. enterica* serotipo Paratyphi) o también, según el hospedero al que presentaban adaptación (por ejemplo *S. enterica* serotipo Abortus-ovis). No obstante, estos criterios no eran del todo correctos, ya que existen cepas de serotipos como Typhimurium, cuyo nombre alude infección en murinos y presentan un amplio rango de hospederos (Grimont y Weill, 2007).

A pesar de que la asignación de nombres a los serotipos de *Salmonella enterica* es arbitraria, estas denominaciones se encuentran muy difundidas por lo que sería difícil sustituirlas por sus fórmulas antigénicas. Además, como los nombres se usan solo para serotipos de la subespecie *enterica*, resulta correcto escribir: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium, *S. enterica* ser. Typhimurium o simplemente *Salmonella* Typhimurium. Para el resto de las subespecies de *Salmonella enterica* y para *Salmonella bongori* se debe emplear la fórmula antigénica (Grimont y Weill, 2007).

I.b. *Salmonella*: contradicción evolutiva

La evidencia experimental ha demostrado que el genoma de los microorganismos con estilo de vida intracelular evoluciona para promover una relación simbiótica con sus hospederos (Bäumler *et al.*, 1998). Generalmente la coexistencia con el hospedero aumenta sus probabilidades de subsistir, sin embargo, en caso de infecciones graves que ponen en riesgo la vida del hospedero conllevaría también la muerte de la bacteria. En este sentido, la evolución de *S. enterica* muestra una tendencia atípica, ya que los serotipos que muestran adaptación a hospederos causan altas tasas de mortalidad. Por lo anterior, se han sugerido tres fases evolutivas para explicar el aumento de virulencia de *Salmonella* (Bäumler *et al.*, 1998).

La Fase 1 es la incorporación al genoma de genes que componen la llamada isla de patogenicidad número 1 (SPI-1) denominados *inv-spa* (Galán *et al.*, 1989; Ginocchio *et al.*, 1992). La SPI-1 se encuentra presente en todas las especies de *Salmonella* y codifica un sistema de secreción tipo III (SST3 de SPI-1) que facilita el transporte de un conjunto complejo de proteínas efectoras que permiten la invasión de *Salmonella* a células epiteliales del intestino del hospedero mediante la modificación de su citoesqueleto (Singh *et al.*, 2018; Vikash, 2013; Fàbregra y Vila, 2013). Esta modificación genética tuvo un papel fundamental en la separación de *Salmonella* de sus antecesores (Vikash, 2013), ya que la SPI-1 está presente en todos los linajes filogenéticos del género *Salmonella* y ausente en su pariente cercano, *Escherichia coli* (Bäumler *et al.*, 1998; Tanner y Kingsley, 2018).

La Fase 2 es la separación dada entre *S. enterica* y *S. bongori* que incluye la adquisición de mecanismos de virulencia nuevos, como la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) (Bäumler *et al.*, 1998). La SPI-2 se compone por dos regiones, la mayor de ellas solo se encuentra en *S. enterica*, lo que sugiere que la incorporación de esta parte de la isla al genoma de *S. enterica* tuvo lugar después de su separación de *S. bongori*, mientras que la región menor se observa en las dos especies (Hensel *et al.*, 1997). La región mayor codifica un segundo sistema de secreción tipo tres (SST3 de la SPI-2), mientras que una región menor codifica para la reducción de tetratoato, un proceso involucrado con la respiración anaeróbica de la bacteria. (Khule y Hensel, 2004; Fàbregra y Vila, 2013). Las funciones de la SPI-2 están ligadas a la supervivencia dentro de los macrófagos (Ilyas *et al.*, 2017), de manera que la bacteria pueda evadir el sistema inmune y lograr una diseminación sistémica. La SPI-2 le confiere ventajas a *S.*

enterica dado que el sistema inmune de los mamíferos y animales de sangre caliente presenta un mayor grado de desarrollo comparado con el de los reptiles y anfibios (Brawn *et al.*, 2007). El ingreso y supervivencia a células de animales de sangre caliente le implica rebasar una mayor cantidad de obstáculos y mecanismos de defensa; esto explica, al menos en parte, la evolución hacia un aumento de virulencia de parte de *Salmonella*.

La Fase evolutiva 3 es caracterizada por el aumento en la diversidad genética de la subespecie *enterica* a través de dos mecanismos, uno es la adquisición de nuevos genes de virulencia y el otro es la degradación genómica.

Con respecto a la adquisición de nuevos genes de virulencia, la subespecie *enterica* incluye la adquisición de aproximadamente 216 genes (Porwollik *et al.*, 2002), a través de diferentes mecanismos como las mutaciones puntuales, transferencia horizontal, deleciones, duplicaciones o rearrreglos genómicos (Tanner y Kingsley, 2018). Como consecuencia de ello, *S. enterica* subsp. *enterica* se ha convertido en un patógeno de gran relevancia en salud pública y en sanidad animal. La gran diversidad de serotipos referidos de *S. enterica* y, sus niveles de virulencia o grado de adaptación al hospedero son factores que pueden verse influenciados por elementos relacionados con el hospedero, el nicho ecológico y las características inherentes del patógeno. Por otro lado, la evolución de serotipos restringidos como Typhi y Paratyphi ha estado marcada por la adquisición horizontal de genes que les confieren factores de virulencia que expresan síntomas de enfermedad sistémica, como fiebre, leucopenia y monocitosis. Los genomas de Typhi y Paratyphi A han sido también objeto de pérdida gradual de información genética, ya que presentan 120 y 173 pseudo genes, respectivamente, de los cuales 30 son comunes en ambos serotipos (McClelland *et al.*, 2004). Entre las funciones perdidas están aquellas asociadas con la colonización del intestino, desencadenamiento de diarrea y utilización del hierro. La acumulación de pseudo genes es un rasgo clave de estos y otros patógenos adaptados a hospederos (Holt *et al.*, 2009).

Como bien es conocido, algunos factores de virulencia o resistencia a antimicrobianos pueden encontrarse en plásmidos. En tal sentido, serotipos de *S. enterica* como Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, entre otros, se distinguen por contener el denominado plásmido de virulencia de *Salmonella* o SPV (Guiney *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2006). Este plásmido contiene el operón *spvRABCD*, que ha

demostrado ser esencial para la multiplicación de la bacteria dentro del hospedero durante infecciones extraintestinales. Se sugiere que los plásmidos son transferidos por procesos de conjugación e incrementan los mecanismos de virulencia y/o resistencia exhibidos en las bacterias receptoras (Foley y Lynne, 2008).

En resumen, durante la evolución de *Salmonella* han existido diversos eventos evolutivos que han encaminado a *Salmonella* a la adquisición de diversidad de genes que pueden sólo estar presentes en ciertos miembros de la misma especie; esto le ha significado ventajas en el proceso de adaptación a nuevos nichos ecológicos.

I.c. Genoma conservado

El genoma de cada organismo es el conjunto completo de información contenida en diversas unidades estructurales llamadas genes que pasan a la siguiente generación con la finalidad de asegurar la supervivencia.

El genoma conservado (usualmente mencionado como “core-genome”) hace referencia a todos los genes comunes a una especie (Rouli *et al.*, 2015). Jacobsen *et al.* (2011) en un estudio conducido con distintas cepas de *Salmonella* encontraron un genoma conservado de 2811 genes (Figura 2).

Según estos autores, entre las principales funciones representadas en el genoma conservado destacan las de transporte y metabolismo de carbohidratos, transcripción, metabolismo de los aminoácidos, estructuras extracelulares, pared o membrana celular, así como funciones hipotéticas y desconocidas.

En otro estudio se identificó una proporción de genes de entre 76 y 82% que realizan una función desconocida en el genoma conservado (Gupta *et al.*, 2019). También se ha observado que *S. enterica* presenta dentro de su genoma regiones conservadas con funciones implicadas en el proceso de adherencia a las paredes intestinales del hospedero (den Bakker *et al.*, 2011). Lo anterior, sugiere que esas regiones, además de conservadas, se encuentran difundidas a lo largo de la especie.

Salmonella presenta factores de invasión, adherencia, supervivencia y virulencia bien desarrollados. A la fecha se han identificado más de 20 SPI dentro del genoma de *Salmonella* (Barreto *et al.*, 2016), aunque las más estudiadas son de la SPI1 a la SPI 5,

que suele estar presentes en el genoma de casi todas las cepas y portan genes codificantes de factores involucrados en casi todas las fases del proceso infeccioso.

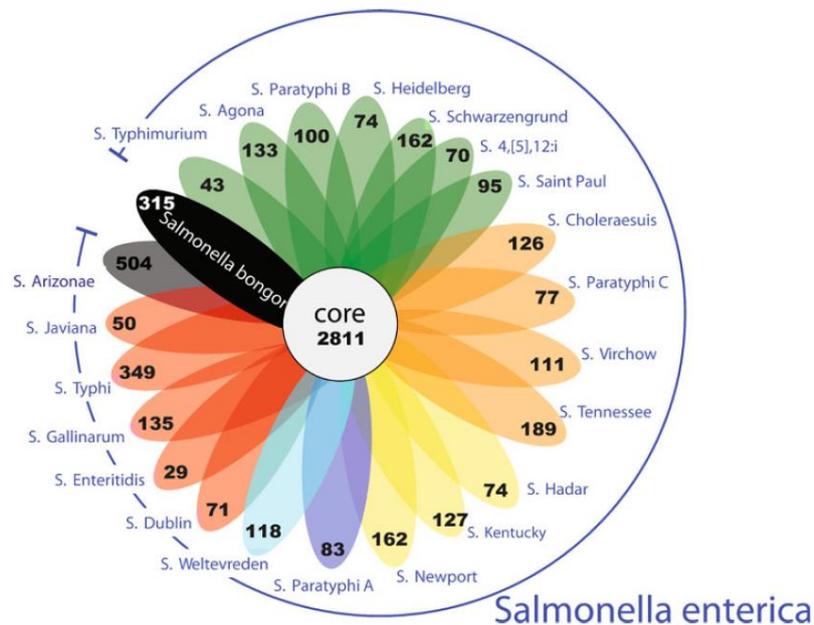


Figura 2. Diagrama que representa el genoma conservado (core) del género *Salmonella* y las familias de genes para cada subespecie. Tomado de Jacobson *et al*, 2011

Muchos de los genes involucrados en la patogenia de salmonelosis muestran un alto grado de conservación en cepas de *Salmonella* no tifoidea; ejemplo de ello son las fimbrias tipo 1, que están codificadas por los genes *fim ACDFHIWYZ* (Desai *et al.*, 2013). También se puede mencionar la expresión de operones *prg*, *org*, *inv*, *spa*, *sic/sip* asociados a genes presentes en la SPI 1 (Fàbrega y Vila 2013).

Se ha sugerido que los genes presentes en la SPI 1 codifican un SST 3 con funciones que le permiten al patógeno internarse, multiplicarse y acumularse en células del hospedero durante el proceso invasivo. Se ha reportado que lo anteriormente mencionado puede ser llevado a cabo en sitios tan distantes como la vesícula biliar y desde ahí favorecer el estado de portador crónico en los casos de individuos recuperados de fiebre tifoidea. (Bäumler *et al.*, 2011).

En el proceso de adhesión de *S. enterica* a las células epiteliales del intestino delgado del hospedero participan diversos genes, entre estos destacan *stbA* y *stbB* que

codifican proteínas fimbriales; además, se ha sugerido la participación de genes como *fimAICDHF* (que codifican para una fimbria tipo 1) y *lpfABCDE* (involucrado con la fimbria polar larga) los cuales se encuentran conservados entre serotipos como Typhimurium, Baidon y Dublin. Los genes *agf/csgABCEFG* codifican para una fimbria delgada agregativa y los genes *stfACDEFG* y *sthABCDE* se encuentran presentes en diversos genomas de distintas cepas de *Salmonella*. El resultado de la codificación de estos genes se encuentra vinculado a procesos de adaptación al hospedero (den Bakker *et al.*, 2011).

Para llevar a cabo los procesos de invasión a las células, *S. enterica* utiliza un sistema de secreción tipo 3 (SST3) necesario para el reordenamiento del citoesqueleto y la posterior internalización de la bacteria. El SST3 se encuentra asociado a la codificación de genes presentes en la SPI 1, por ejemplo, los operones *prg*, *org*, *inv*, *spa*, que cifran para las estructuras necesarias del SST3, además, los operones *sic/sip* codifican proteínas efectoras. (Fàbrega y Vila, 2013).

Por otro lado, se ha comprobado la existencia de genes que le permiten a *Salmonella* colonizar tanto el sistema linfático como los intestinos de los bovinos, y son aquellos contenidos en la SPI 1, SPI 2 y el gen *rfb* que codifica para el antígeno O. Este proceso parece desarrollarse sin la exhibición de signos clínicos de parte del animal (Vohra *et al.*, 2019 b).

Lo anterior ayuda a explicar, por lo menos en parte, la aparición de animales portadores del patógeno y sin signos de la enfermedad, que son incorporados a la cadena productiva de la carne diseminando *Salmonella* y generando un peligro a la salud pública.

A pesar de que el genoma conservado representa una proporción importante del genoma completo de *Salmonella*, este patógeno, como se describió anteriormente, manifiesta una gran diversidad de fenotipos (Grimont y Weill, 2007; Smith *et al.*, 1990). Lo anterior es resultado de los procesos de adaptación evolutiva a los diferentes hospederos y/o nichos ecológicos en los que el patógeno se desenvuelve.

I.d. Genoma adaptativo

El genoma adaptativo (referido también como accesorio) no es material genético adquirido aleatoriamente, sino un complemento de genes y elementos reguladores que permiten la sobrevivencia de cepas de *S. enterica* dentro de nichos específicos (Laing *et al.*, 2017).

El genoma accesorio presenta variaciones en cuanto al número de genes involucrados, pues se han reportado desde 12,429 genes en *S. enterica* subsp. *arizonae* hasta 33,257 en *S. enterica* subsp. *enterica* (Park y Andam, 2020). Esto explica, al menos en parte, la gran diversidad de fenotipos observados en *S. enterica*.

Un componente notable del genoma accesorio de *S. enterica* (40% del total) está compuesto de genes específicos de serotipo (exclusivos) y genes huérfanos (genes sin homólogos detectados en otros linajes evolutivos o taxonómicos). Estos han sido vinculados a rasgos de patogenicidad que le han permitido a la especie ventajas en su adaptación a nuevos nichos ecológicos (Park y Andam, 2020).

La recombinación de genes en el genoma de *Salmonella* se calcula en poco más de 12,000; algunos de los genes que más frecuentemente son recombinados tienen función hipotética o desconocida, mientras que aquellos genes con frecuencias de recombinación altas incluyen a *fliC*, que codifica proteínas flagelares *thiH*, que está involucrado en la síntesis de timina así como *metE* y *metH* que se encuentran involucrados en la síntesis de metionina (Park y Andam, 2020).

La gran diversidad genética presente en *S. enterica* parece estar correlacionada con el rango de hospederos que infecta, ya que los serotipos adaptados a un hospedero muestran una baja diversidad genética comparado con serotipos generalistas. La variación fenotípica generada por la variación genética permitió la sobrevivencia en una amplia variedad de hospederos (Winfield y Groisman, 2013). Como ejemplo de esta diversidad está *Salmonella* Typhi que debido a la pérdida de genes funcionales; terminó adaptándose exclusivamente a un solo hospedero. En este caso, los genes inactivados o interrumpidos representan aproximadamente el 5% de su genoma (Parkhill *et al.*, 2001).

Por otro lado, *Salmonella* Typhimurium presenta los genes *misL*, *shdA*, *siiE* y *ratB*, los cuales están involucrados en la colonización intestinal, con lo anterior, este patógeno ha logrado mantener un amplio rango de hospederos (Sabbagh *et al* 2010). Las diferencias presentadas en los factores de virulencia y colonización entre *Salmonella*

Typhimurium y Thyphi afectan las interacciones entre patógeno y hospedero, así como la enfermedad que desencadenan ambas en humanos (Gal-Mor *et al.*, 2014).

Como se señaló con anterioridad, las islas de patogenicidad de *Salmonella* son fuente de genes de patogenicidad. Existen islas que pertenecen al genoma conservado y otras al genoma adaptativo, ejemplo de estas últimas es la SPI-7 que se encuentra presente solamente en algunos serotipos y contiene genes como el *viaA* y *viaB* que codifican para el antígeno Vi (Gerlach y Hensel, 2007), además, también se ha reportado la presencia de la misma isla en los serotipos de Dublin y Paratyphi. (Jacobsen *et al.*, 2011). Se ha sugerido también que la SPI-14 juega un rol en la especificidad del hospedero, esta isla aparece en el genoma del serotipo Typhimurium (Sabbagh *et al.*, 2010). Todo lo anterior sugiere que la presencia de algunas SPI's en unas cepas y su ausencia en otras, ayuda a que *S. enterica* exhiba los distintos fenotipos que caracterizan a la subespecie.

Los genes que codifican la formación de flagelos, que también son parte del genoma accesorio, contribuyen a la adaptación ecológica del patógeno permitiendo a la célula ajustar su expresión mediante la fase de variación cuando encuentra un nuevo nicho (Smith *et al.*, 1990) y a la generación de nuevos serotipos. La motilidad dada por los flagelos juega un rol en la colonización del hospedero, adhesión superficial y formación de biofilm, por lo tanto, también son factores de virulencia importantes en *Salmonella* (Horstmann *et al.*, 2017). Esto explica parcialmente el por qué un serotipo de *S. enterica* en particular, puede exhibir un determinado nivel de virulencia o poseer un fenotipo en particular (Laing *et al.*, 2017).

Los plásmidos de virulencia encontrados en algunos serotipos de *Salmonella enterica* incluyendo Dublin, Cholerasuis, Gallinarum, Typhimurium y Enteritidis, aportan genes como los *spvRABCD*; lo anterior es debido a que promueven la proliferación intracelular en los tejidos intestinales y en los sitios extraintestinales; lo anterior se traduce en un aumento de la virulencia de las cepas que los contienen (Saldarriaga y Rugeles, 2001).

Otra característica observada en ciertos serotipos de *S. enterica* es la resistencia a antimicrobianos, que en gran parte también pertenece al genoma accesorio. Se han observado cepas de *S. enterica* con presencia de genes que le permiten la resistencia a la tetraciclina; los genes *tetA*, *tetB*, *tetD* y *tetD* son los más frecuentes detectados en enterobacterias y los mecanismos de resistencia que codifican esos genes incluyen

eflujos dependientes de energía, protección ribosomal e inactivación enzimática (Nde y Logue, 2008). El gen *tetA* ha sido encontrado en los plásmidos y en el cromosoma mientras que los genes *tetB*, *tetC* y *tetD* han sido detectados en los cromosomas de diferentes serotipos de *S. enterica* como Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar y Saintpaul (French y Schwarz, 2000).

En el mismo orden, también han sido observado genes que confieren resistencia a la estreptomicina como *strA*, *strB*, y *aadA1*, los cuales han sido descritos en genomas de serotipos generalistas (Sundin y Bender, 1996).

La translocación bacteriana es un mecanismo adaptativo, presente en el genoma accesorio, que le permite a *Salmonella* pasar desde la mucosa intestinal hasta el sistema linfático y diseminarse a través del mismo (Vohra *et al.*, 2019 a).

El género *Salmonella* muestra evidencia de una combinación de factores intrínsecos, procesos evolutivos y ambientes selectivos (nichos ecológicos) en su genoma. Dentro de estos procesos, se ha sugerido que la recombinación genética le ha conferido habilidades que le permiten responder ante presiones como la respuesta inmune por parte del hospedero y al tratamiento con antibióticos (Park y Andam, 2020).

I.e. Epidemiología de la salmonelosis. Tifoidea y no tifoidea

Como se refirió anteriormente las cepas de *S. enterica* pueden dividirse por su importancia clínica en cepas tifoideas, restringidas al humano, y en cepas no tifoideas (SNT), que infectan a humanos y animales, con algunas pocas cepas altamente adaptadas a alguna especie animal en particular (Cuadro 1).

Los serotipos de SNT están adaptados para desatar un proceso de enteritis y para desarrollarse en el ambiente que produce el intestino inflamado del hospedero. Usan esta característica para superar a la microbiota presente y así vencer la resistencia a la colonización (Stecher *et al.*, 2007). Por otra parte, los serotipos tifoideos no presentan esta característica, en cambio, cuentan con la capacidad de prosperar en sitios sistémicos (Gal-Mor *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Agrupación de serotipos de *Salmonella* en base a su hospedero

Grupo	Serotipo	Hospedero	Infección
Generalistas	<i>S. enterica</i> serotipos Typhimurium, Enteritidis, Anatum, Kentucky, Reading	Humanos, aves, bovinos, cerdos y ratones	Enterocolitis en humanos y cerdos, asintomáticos en bovinos y aves, septicemia en ratones
Adaptados al hospedero	<i>S. enterica</i> serotipos Dublin y Cholerasuis	Bovinos, cerdos	Septicemia, enterocolitis en bovinos e infección sistémica fatal en cerdos
Restringidos al hospedero	<i>S. enterica</i> serotipos Typhi y Paratyphi	Humanos	Fiebre tifoidea en ambos

Adaptado de Vikash, 2013.

Las cepas tifoideas son causantes de la enfermedad llamada fiebre tifoidea o paratifoidea (según el serotipo involucrado) y causan sintomatología prácticamente similar. Es una fiebre entérica invasiva, sistémica y potencialmente mortal. La enfermedad es frecuente en países en vías de desarrollo y su presencia está asociada a la poca disponibilidad tanto de agua como de alimentos inocuos, lo que propicia la transmisión fecal-oral (Gal-Mor *et al.*, 2014).

Datos de los Centros para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) reportan 288 casos de fiebre tifoidea en ese país en 2017 (CDC, 2017). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene estimaciones anuales de más de 11 millones de personas que enferman y de más de 128 mil muertes a escala mundial (OMS, 2018 a). En México, datos del sistema nacional de vigilancia epidemiológica de la Secretaría de Salud indican casi 28 mil casos de salmonelosis tifoidea para el año 2020 (SSA, 2020).

Por otro lado, a diferencia de la fiebre tifoidea, la salmonelosis atribuida a cepas de SNT sucede prácticamente a nivel mundial. Datos de los CDC reportan anualmente alrededor de 1.3 millones de personas infectadas con 26,500 hospitalizaciones, además de 450 muertes en los Estados Unidos (CDC, 2018). Para el caso de México, la Secretaría de Salud reportó un acumulado anual de casi 78,681 casos de salmonelosis en 2020 (SSA, 2020). La transmisión de esta enfermedad puede resultar por contacto con animales infectados o por el consumo de alimentos contaminados (CDC, 2018 b). Cabe indicar que, con base en la amplia distribución y el mayor número de casos, las cepas de SNT resultan de mayor relevancia en salud pública que las tifoideas.

Los alimentos crudos de origen animal suelen estar frecuentemente vinculados a la transmisión de *Salmonella*. Entre estos, las carnes de diferentes animales juegan un papel importante (CDC, 2018 b). En el caso específico de los bovinos presentan productos con presencia del patógeno, por ejemplo, las canales suelen ser reportadas con porcentajes de positividad que van desde 1.5% en Canadá (Bohaychuk *et al.*, 2011), 5.1% en Brasil (Cunha-Neto *et al.*, 2017) y 15.4% en México (Perez-Montaña *et al.*, 2012). Las frecuencias de contaminación con este patógeno suelen ser mucho más elevadas en el caso de carne molida, observándose porcentajes de contaminación de 8.3% en Brasil (Cunha-Neto *et al.*, 2017), 20% en Malasia (Shafini *et al.*, 2017) y hasta 68.5% en México (Cabrera-Diaz *et al.*, 2012).

A pesar de las múltiples acciones que se toman en rastros y en cadenas de distribución de los productos, la contaminación con *Salmonella* sigue estando presente. El último brote reportado en los Estados Unidos vinculado a la transmisión de *Salmonella* Dublin en carne molida de res inició en agosto de 2019 y cobró una vida, ocho personas requirieron hospitalización y 13 personas resultaron infectadas (CDC, 2019).

De aquí la importancia de estudiar las cepas asociadas con alimentos de origen animal, entre ellos la carne de bovino, pues se ha demostrado que esta especie constituye un reservorio importante de *Salmonella* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de muestras positivas a *Salmonella* spp. en diferentes matrices biológicas de la especie bovina

País	Canales	Año	Referencia
México	18%	2015	Martínez-Chávez <i>et al.</i> , 2015
Irlanda	0.30%	2014	Khen <i>et al.</i> , 2014
México	3%	2020	Garza-García <i>et al.</i> , 2020
Heces			
México	91.00%	2017	Narvaez-Bravo <i>et al.</i> , 2013
México	34%	2020	Garza-García <i>et al.</i> , 2020
Estados Unidos	9.10%	2017	Mollenkopf <i>et al.</i> , 2017
Piel			
México	92.40%	2013	Narvaez-Bravo <i>et al.</i> , 2013
México	100.00%	2013	Gragg <i>et al.</i> , 2013
Irlanda	0.80%	2014	Khen <i>et al.</i> , 2014
Linfonodos			
México	57.80%	2013	Gragg <i>et al.</i> , 2013
USA	4-88%	2012	Haneklaus <i>et al.</i> , 2012
México y Estados Unidos	52%	2019	Nickelson <i>et al.</i> , 2019
Carne molida			
Irlanda	3.00%	2014	Khen <i>et al.</i> , 2014
China	6.80%	2016	Yin <i>et al.</i> , 2016
México	29.70%	2017	Villalpando-Guzmán <i>et al.</i> , 2017

Como se observa en Cuadro 2, se ha aislado *Salmonella* de muestras provenientes de heces y de piel, lo que sugiere que los bovinos son portadores del patógeno mediante la ruta fecal-oral. Sin embargo, lo anterior no explica por completo la alta frecuencia de contaminación con *Salmonella* en productos como carne molida.

Son diversos los estudios que han sugerido que *Salmonella* puede sobrevivir dentro del sistema linfático de los bovinos y los nódulos linfáticos ser una fuente de infección. (Haneklaus *et al.*, 2012; Gragg *et al.*, 2013; Arthur *et al.*, 2008). Los nódulos linfáticos periféricos se encuentran distribuidos a lo largo de la canal, y suelen estar cubiertos de tejido adiposo, por lo que se hace muy difícil su identificación y su posible retiro a nivel industrial. También, se ha encontrado positividad a la bacteria en diversos nódulos linfáticos de animales (Garrido *et al.*, 2019); principalmente en los mesentéricos, aunque estos son generalmente retirados para el consumo humano, minimizando así el riesgo a la salud pública.

Se ha sugerido que una causa probable para la aparición del patógeno en carne molida, es la práctica de añadir los nódulos linfáticos y grasa circundante de los mismos como parte de los recortes para la elaboración del producto (Arthur *et al.*, 2008). Para estimar la presencia en carne molida de *Salmonella* proveniente de los nódulos linfáticos, el estudio de Li *et al.* (2015) mostró mediante el uso de modelos de simulación estocástica, que el 90% de la contaminación con el patógeno al producto es atribuida a los nódulos linfáticos.

En el estudio realizado en Estados Unidos por Arthur *et al.* (2008) se encontró que, de un total de 1,140 nódulos linfáticos obtenidos, aquellos correspondientes al flanco y cuello de los bovinos, presentan porcentajes de positividad del patógeno que van de 0.86 a 3.31%. El estudio de Haneklaus *et al.* (2012) demostró que los NLP provenientes de animales de diferentes corrales de engorda, oscilaban en positividad a *Salmonella* de 0 y 88.2%. Por su parte, Gragg *et al.* (2013) encontraron prevalencias de *Salmonella* en animales que arribaron a rastro de 55.9% para nódulos linfáticos mandibulares, 91.2% en nódulos linfáticos mesentéricos, 7.4% para mediastínicos y 76.5% para nódulos subilíacos, lo que sugiere que *Salmonella* una vez que llega al sistema linfático, puede distribuirse a través del mismo.

Un hallazgo que resulta interesante es el de Webb *et al.* (2017), quienes encontraron porcentajes de 7.1% de animales positivos para ganado proveniente de corral de engorda comercial y de 8.1% para ganado de desecho. Además, encontraron que los porcentajes de *Salmonella* aumentan durante la temporada más cálida del año en comparación con la temporada fría (8.2 contra 2.4%, respectivamente). Esto sugiere que el sistema de producción de los animales, así como la época del año, pueden aumentar el riesgo consecuente de infecciones humanas.

I.6. Diversidad y linajes genéticos de *Salmonella* en bovinos

La diversidad genética de *S. enterica* subsp. *enterica* que puede encontrarse circulando en el nicho ecológico particular que representa la especie bovina, es amplia (Bosilevac *et al.*, 2009).

Sin embargo, hay poca información que permita establecer la cercanía o divergencia genética que pueden mostrar en cada caso particular, ya que, por lo general los aislamientos no se caracterizan genéticamente.

Para poner en contexto la relevancia clínica de *Salmonella*, investigadores en otros países trabajando en ganado especializado en producción de carne en engorda comercial, compararon los patrones obtenidos a partir de la aplicación de la técnica molecular de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE por sus siglas en inglés). Ello les confirmó la presencia de complejos clonales dentro de un mismo corral de engorda, con un porcentaje cercano al 90% de homología, lo cual sugiere la amplia diseminación de cepas entre los animales que habitan el corral (Mollenkopf *et al.*, 2017) y que tienen potencial para ser incorporadas a la cadena productiva de la carne.

Por otro lado, Sandt *et al.* (2013) encontraron mediante la aplicación de PFGE patrones iguales en cepas de *S. enterica* obtenidas a partir de muestras provenientes de productos de bovinos con muestras provenientes de casos clínicos de humanos. Ello llevó a los autores a sugerir que los animales de producción, juegan un papel importante en la aparición de casos clínicos en humanos.

Al mismo tiempo, investigadores en Estados Unidos, (Rodríguez-Rivera *et al.*, 2014) encontraron evidencias que sugieren que cepas obtenidas a través de muestras tomadas en el medio ambiente de granjas y heces de bovinos sin muestras de sintomatología clínica resultaron genéticamente similares a cepas que fueron causantes de casos clínicos de salmonelosis en humanos en la misma área geográfica.

Por otra parte, el serotipo Typhimurium de *S. enterica*, es uno de los más comúnmente aislados (Lan *et al.*, 2009) tanto de fuentes animales como de casos clínicos en humanos (Andino y Hanning, 2015). Dicho serotipo ha desarrollado una diversidad genética considerable, pues la mayoría de los aislamientos representan complejos clonales simples (Lan *et al.*, 2009). Por ejemplo, el linaje DT-04 se encuentra diseminado alrededor del mundo en muestras de bovinos y además se ha observado

que presenta multiresistencia a antibióticos como la ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamida y tetraciclinas (Leekitcharoenphon *et al.*, 2016); además de la adquisición de resistencia adicional a antibióticos como las quinolonas (Helms *et al.*, 2005). Lo anterior puede significar un problema de salud pública importante, por eso es necesaria la identificación de las cepas circulantes en animales de producción como los bovinos.

Además, se ha observado que genomas de serotipos de *S. enterica* adaptados a los bovinos, muestran mutaciones puntuales en algunos genes. Por ejemplo, los genes *arnD*, *srmB* y *aspA* están involucrados en la modificación de la membrana externa de lipopolisacáridos, ello sugiere que tales cambios se traducen en resistencia a los tratamientos con polimixina y colisistina, que son antimicrobianos usualmente empleados contra la enfermedad con manifestación clínica en los bovinos. De igual forma, los genes *repE* y *hicB*, cuyas funciones han sido relacionadas con la codificación de proteínas que favorecen la replicación dentro de las células de hospedero y con la producción de toxinas que generan condiciones bacteriostáticas para otras células bacterianas, han sido reportados en las cepas de *Salmonella* que se aíslan en muestras provenientes de bovinos y pueden significar una ventaja sobre otros patógenos presentes al momento de la infección (Vila Nova *et al.*, 2019).

Dada la cualidad de *Salmonella* de representar un microorganismo altamente clonal y la capacidad para recombinar su genoma, resulta primordial realizar estudios que proporcionen evidencia de la diversidad genética de cepas que circulan en algún nicho en específico para realizar una mejor caracterización de las mismas y generar posibles estrategias de contención o mitigación del patógeno que coadyuven a minimizar riesgos en salud pública.

II. Metodología

II.a Aislamiento de cepas de *Salmonella*

Los genomas usados en este estudio fueron obtenidos de aislamientos provenientes de un estudio previo conducido por nuestro equipo de trabajo (Palós *et al.*, 2020). En dicho estudio, los aislamientos fueron sometidos a la secuenciación completa del genoma y predicción de serotipo *In silico*. Para describir aspectos relevantes de esos aislamientos, se proveen algunos detalles que son importantes para comprender el desarrollo de mi trabajo.

Los aislamientos obtenidos a partir de nódulos linfáticos superficiales de bovinos (LNS, n=401) nódulos linfáticos profundos (LNP, n=399), carne molida con grasa (CG, n=382) y carne molida magra (CM, n=363) fueron recolectados de canales de bovino en un Centro de Distribución en la Ciudad de México durante un período de dos años (abril 2017 a diciembre de 2018). Las canales distribuidas en este Centro provienen de una empresa verticalmente integrada (operaciones de engorda y matanza) localizada en el estado de Veracruz. Los animales que se cosechan corresponden a machos jóvenes (entre 20 y 25 meses) de una cruce de *Bos indicus*. De cada canal se obtuvieron los nódulos linfáticos superficiales (cervical superficial y subilíaco), profundos (axilar propio y celíaco), carne magra y recortes de grasa y se sometieron a procedimientos de detección y aislamiento de *Salmonella* spp. Una descripción completa de los análisis de *Salmonella* se encuentra disponible en protocols.io (dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bpybmpsn) así como también en Palós *et al.* (2020) Cada aislamiento fue obtenido de una muestra diferente en un periodo de dos años de muestreo. En general, se evidenció una fuerte asociación entre el tipo de muestra y la positividad a *Salmonella* ($\chi^2=23.7$, $P<0.0001$), con una mayor probabilidad de encontrar muestras positivas en LNS que en las demás fuentes (razón de probabilidades 3.2, intervalo de confianza al 95% 2.0-5.0, $P<0.0001$) (Cuadro 3).

II.b Secuenciación de genomas de cepas de *Salmonella*

Los aislados puros de *Salmonella* se sometieron a secuenciación completa del genoma. Se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) de colonias incubadas en medios de cultivo agar soya tripticasa (TSA) y agar xilosa lisina y desoxicolato (XLD), para tal propósito se utilizó el kit de preparación PCR-High Purity Template (Roche, México) acorde con las instrucciones del fabricante. Después de esto, el ADN fue cuantificado, usando el Fluorometro Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific México). La secuenciación se realizó en un equipo Nextseq de Illumina, mediante el uso del kit Nextera XT versión 3 (Illumina Inc. San Diego Ca. EUA); para preparar la biblioteca de ADN con fragmentos de 150 pares de bases y una profundidad estimada mínima de 30X. Las secuencias crudas se encuentran disponibles en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los números de acceso y metadatos se presentan en la sección de Anexos, en el Anexo 1.

Las lecturas crudas obtenidas fueron sometidas a la predicción de serotipo *In silico* mediante el uso de la herramienta SeqSero (Zhang *et al*, 2015) (disponible en <http://www.genomicepidemiology.org>) que compara la secuencia de los genes de los antígenos somáticos (cluster de genes *rfb* y genes *wzx* y *wzy*) y flagelar (*fliC* y *fljB*) de los genomas en estudio con una base de datos que contiene los genes de referencia de ambos antígenos, utilizados para determinar el serotipo según el esquema de Kauffman-Whitte-Le Minor (Grimont *et al*, 2017). Los resultados se encuentran en Palós *et al*. (2020)

II.c Obtención de genomas completos

A continuación, las lecturas crudas se sometieron a procesos de evaluación de calidad, depuración, ensamblado para generar genoma completo y se realizó la anotación del genoma.

Para evaluar la calidad inicial de las lecturas crudas se usó el programa FastQC (Andrews, 2010). Con estos resultados se busca minimizar el error en el llamado de bases. Las lecturas crudas se sometieron a un proceso de depuración que sirvió para eliminar los adaptadores de secuenciación de Illumina y para eliminar las lecturas de pobre calidad. Lo anterior se realizó mediante el uso del programa Trimmomatic (Bolger *et al*, 2014).

Después del proceso de depuración, se procedió a realizar el ensamblado de las lecturas crudas, para obtener un genoma completo; este paso se realizó mediante el uso del servidor Pathogen Resource and Integration Center (PATRIC) (disponible en <https://www.patricbrc.org/>) (Wattam *et al*, 2014) utilizando el algoritmo de ensamblado SPAdes. Además, en este paso se realizó una evaluación de calidad de los genomas ensamblados, buscando tener el menor número de contigs, y se constató el tamaño del genoma que en el caso de *Salmonella* consta de alrededor de 5,000,000 de pares de bases (PB).

Finalmente, la anotación del genoma se llevó a cabo una vez que los genomas se encontraban ensamblados, haciendo uso del servidor de Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) (disponible en www.https://rast.nmpdr.org/) (Overbeek, *et al.*, 2014) sitio especializado en anotación de genomas de células procariotas. RAST identifica las

secuencias codificantes en los genomas ensamblados y le asigna función biológica en caso de que esta sea conocida.

II.d Pangenoma

Para conocer el contenido de genes conservados y los accesorios, así como los grupos de genes ortólogos tanto de genomas provenientes de cepas aisladas de carne molida como aquellas aisladas de nódulos linfáticos, se realizó un análisis de Pangenoma. Esto se desarrolló mediante el uso del programa: Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) (Chaudhari *et al.*, 2016).

II.e Análisis Filogenético

En la aplicación de estos análisis, se generaron dos árboles de máxima verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) haciendo uso de la herramienta RAxML y basado en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) bajo el modelo evolutivo GTR + GAMMA, y con 100 repeticiones (bootstraps) para lo anterior, se utilizó el programa de PhaMe (Phylogenetics and Molecular Evolution analysis tool) (Shakya *et al.*, 2020).

Un primer análisis se realizó utilizando 77 secuencias de genomas provenientes de cepas aisladas y caracterizadas por Palós *et al.* (2020). (Cuadro 3).

Un segundo análisis fue desarrollado empleando 127 secuencias de genomas de *Salmonella enterica*, de los cuales, 40 pertenecen al proyecto y fueron seleccionados tratando de representar el árbol del primer análisis y los 87 restantes se incluyeron en base al serotipo y fuente (animal, vegetal, alimentos y origen clínico en humanos). Los 87 genomas fueron tomados de la base de datos pública del NCBI. Tanto los números de acceso como los metadatos se presentan en el anexo 1 en la sección de Anexos.

Cuadro 3. Procedencia de los genomas de cepas de *Salmonella enterica* usados en el presente estudio (Nódulos linfáticos superficiales=LNS, nódulos linfáticos profundos=LNP, carne molida con grasa=CG y carne molida sin grasa= CM).

Serotipo	LNS	LNP	CG	CM
Anatum	16	2	5	0
Reading	9	4	5	4
Typhimurium	1	0	4	6
London	4	4	1	0
Kentucky	5	0	0	1
Fresno	2	0	2	0
Give	1	0	0	0
Muenster	0	0	1	0

Para realizar los análisis de Pangenoma y Filogenéticos, los genomas se agruparon como nódulos linfáticos y carne molida, independientemente de la matriz de procedencia. Política

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.a Pangenoma indica presión evolutiva en el nicho ecológico

Mediante la realización de un análisis de Pangenoma en las 77 cepas de *Salmonella* se encontraron \approx 4,900 de genes totales (conservados y accesorios) y alcanzaron un Pangenoma de 9,328 genes; esto concuerda con cantidades de genes presentes en *Salmonella* previamente reportadas (Jacobsen *et al.*, 2011).

III.a1 Genoma conservado

Acorde con sus funciones conocidas, los genes pueden dividirse en genes esenciales y genes no esenciales. Los esenciales son aquellos que pertenecen al genoma conservado (core) y que son comunes a todos los genomas estudiados. Sus funciones son imprescindibles para la bacteria porque codifican funciones fundamentales para la vida. Mientras que los no esenciales pertenecen al genoma adaptativo (accesorio) y están relacionados con funciones que pueden ser silenciadas sin efectos letales para el fenotipo (Dilucca *et al.*, 2018).

En un análisis más detallado, se observó que dentro de los genomas de cepas provenientes de nódulos linfáticos el promedio de genes conservados fue de 3,873 (DE \pm 155.37) mientras que para aquellas que procedieron de carne molida fue de 3,752 (DE \pm 173.84) (Figura 3). Estos resultados indican que el promedio de genes conservados es mayor en genomas de cepas que provinieron de nódulos linfáticos, por lo que el nicho ecológico parece ofrecer condiciones para que *Salmonella* presente un contenido mayor de estos genes, por lo tanto, parece estar más adaptada a ese medio.

III.a2 Genoma adaptativo

En el genoma adaptativo, se encontró en promedio un número mayor de genes, 1,042 (DE \pm 97.88) para cepas provenientes de nódulos linfáticos, comparado con 1,122 genes (DE \pm 113.67) para cepas procedentes de carne molida (Figura 3). Este resultado sugiere que las cepas de *Salmonella* provenientes de carne molida necesitan más genes que le permitan desplegar características adaptativas en su nicho ecológico.

III.a3 Funciones contenidas en los genomas

Los genes suelen agruparse en familias, de acuerdo al porcentaje de identidad de su secuencia e identificando homología dentro y entre genomas (Jacobsen *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta lo anterior, las funciones de las familias de genes conservados, y accesorios de los 77 genomas de este estudio fueron clasificados usando la base de datos de los grupos de genes ortólogos COG (de las siglas en inglés: Cluster of Orthologous Groups) (Tatusov *et al.*, 2003). Las funciones fueron catalogadas en 20 COG y se encuentran descritas en la Figura 3.

La Figura 3 muestra un mayor número de genes adaptativos en 17 de 20 (85%) de los COG's. Las funciones de metabolismo, patogenicidad, reproducción y de diversidad

bacteriana son las que presentan una mayor cantidad de genes pertenecientes a esta categoría. La abundancia en genes no esenciales en las categorías descritas sugiere que esas familias de genes fueron adquiridas para una mejor adecuación a los nichos ecológicos y mayor diversidad del patógeno. Así mismo, la presencia de un mayor número de genes adaptativos (1,122), dentro de genomas de cepas provenientes de carne molida sugiere que este nicho le representa una mayor dificultad de adaptación en comparación con los nódulos linfáticos. Por otro lado, lo que contribuye a explicar la adaptación a múltiples hospederos de parte de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* es el hecho de contener elementos dentro de su genoma accesorio que codifican para procesos de invasión, supervivencia y multiplicación (Vila Nova *et al.*, 2019).

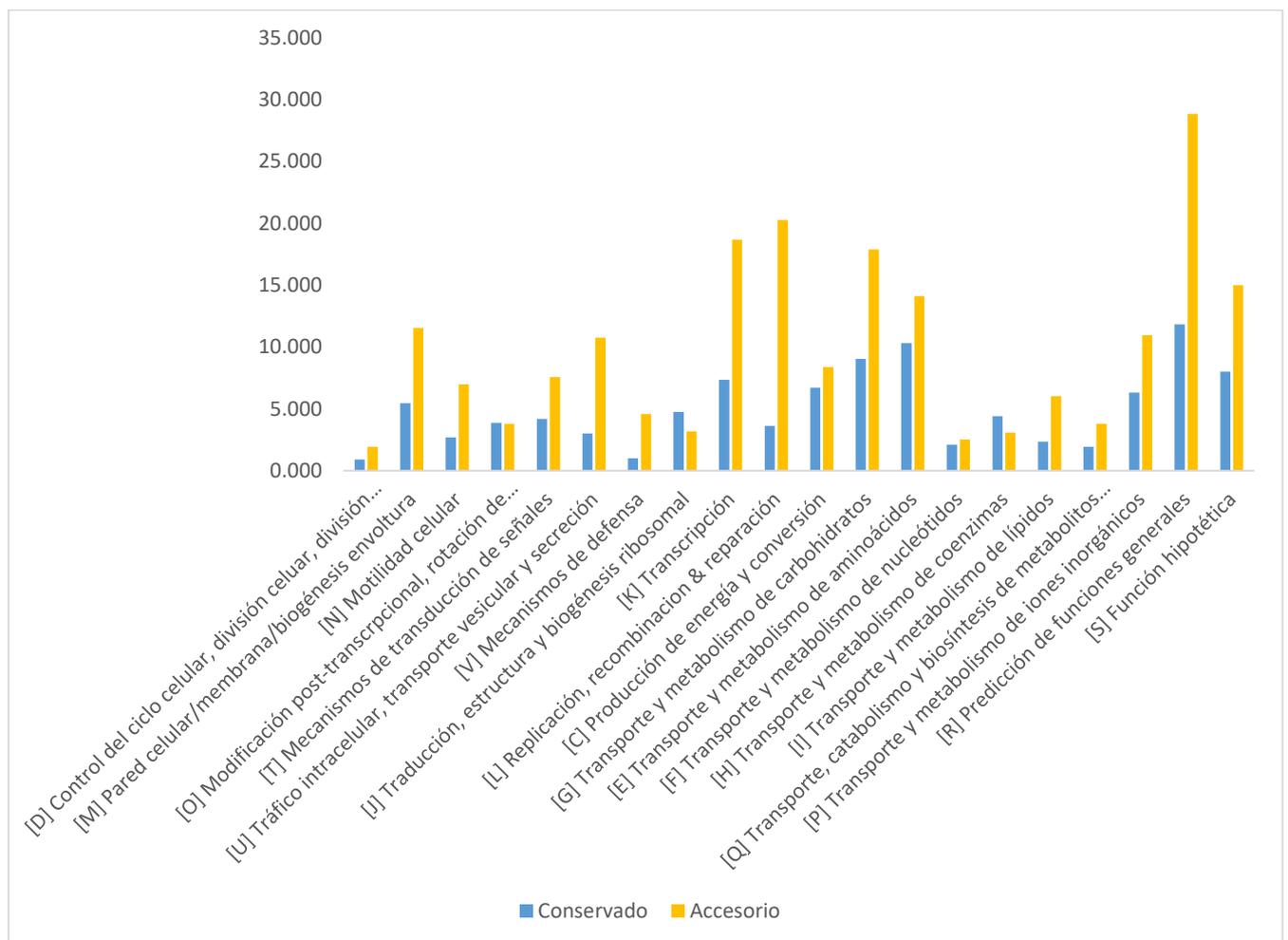


Figura 3. Genes conservados y accesorios distribuidos en las diferentes categorías de los grupos de genes ortólogos (COG) de las 77 cepas de *Salmonella enterica* secuenciadas donde se observa un contenido superior correspondiente al genoma accesorio en 17 de 20.

III.a4 Pangenoma y genoma conservado de cepas de *Salmonella enterica*.

La Figura 4, muestra el comportamiento del Pangenoma y del genoma conservado, conforme se añaden genomas, el Pangenoma aumenta y el conservado decrece, ello muestra que *Salmonella* es un organismo de genoma cerrado, comparado con bacterias como *E. coli* que suele ser más abierto (Jacobsen *et al.*, 2011), llegando a presentar contenidos que van desde 4,200 hasta 5,500 genes totales (Robins-Browne *et al.*, 2016).

La línea de Pangenoma se muestra un crecimiento constante conforme se agregan genomas y se van haciendo palpables los aumentos perceptibles en posiciones donde ocurre una introducción de serotipo nuevo en la línea de tiempo (Figura 4, resaltados con puntos rojos). Por lo tanto, un factor como el cambio de serotipo, parece influir en las diferencias del contenido genético conservado de las cepas.

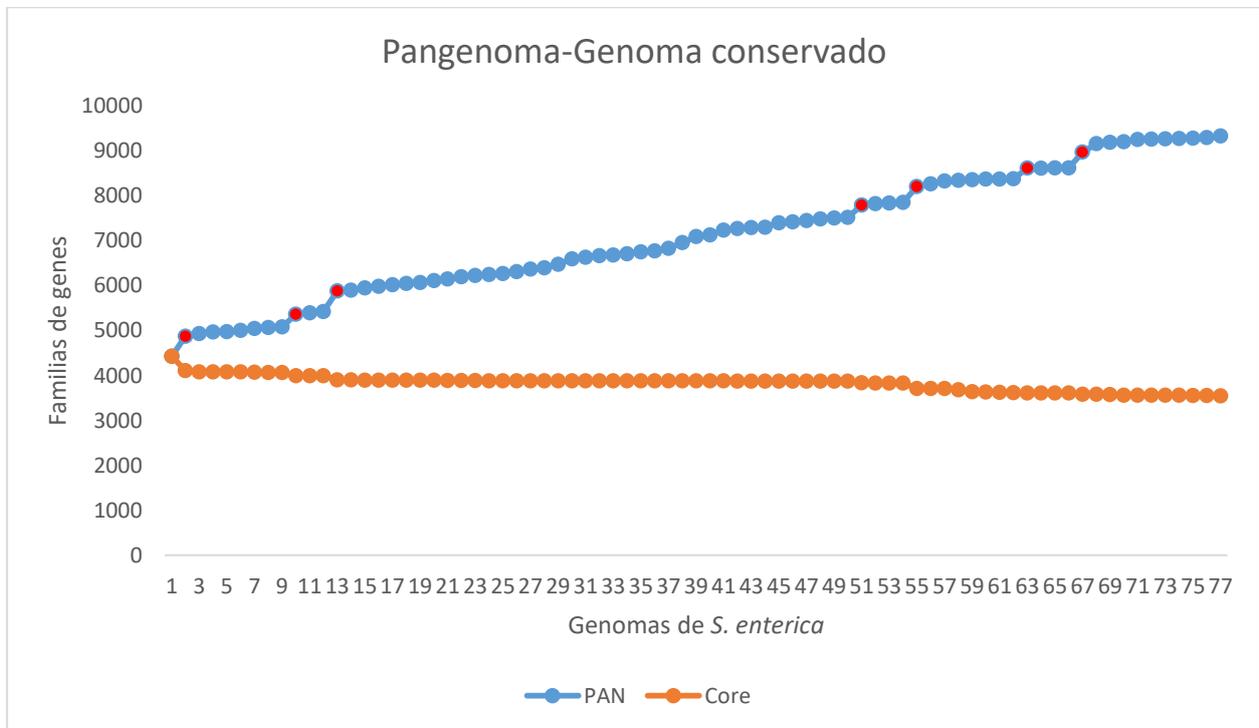


Figura (4) Diagrama del Pangenoma y el genoma core de 77 cepas de *Salmonella enterica*. La línea azul muestra un aumento progresivo conforme se agregan genomas. Los puntos rojos corresponden a la introducción de nuevo serotipo.

III.b Filogenia revela el aporte de *Salmonella* de nódulos linfáticos a carne molida

El análisis filogenético aplicado a genomas de cepas de nódulos linfáticos y carne molida se observa en la Figura 5. La cual fue elaborada con 77 genomas de *Salmonella enterica* y muestra que se conformaron dos subclados genéticamente divergentes, con 100% de soporte estadístico.

En el subclado más pequeño (n=12) se agruparon genomas de cepas de los serotipos Kentucky, Fresno, Give y Muenster; mientras que el otro subclado incluyó genomas de las cepas restantes (n=65) y contiene los serotipos predominantes: Anatum, Reading, Typhimurium y London.

La Figura 5 muestra que los serotipos Anatum, Reading, London, Kentucky y Fresno fueron los más frecuentes entre los aislamientos analizados (83.1%). Dentro de estos mismos serotipos, se aprecian genomas que resultaron genéticamente indiferenciables sin importar si procedieron de nódulos linfáticos o carne molida, lo anterior, con un 100% de soporte estadístico. Este resultado hace resaltar el papel de los nódulos linfáticos provenientes de bovinos aparentemente sanos, como una fuente de contaminación a la carne molida con cepas de *Salmonella enterica*.

Dicho resultado se interpreta como un riesgo a la salud pública, toda vez que los serotipos mencionados presentan una distribución mundial y han sido previamente vinculados a infecciones en humanos (Ferrari *et al.*, 2019); ejemplo de lo anterior, son las cepas de los serotipos Anatum y Reading. Asimismo, las cepas del serotipo Kentucky son genéticamente similares a aquellas causantes de infecciones en humanos en Estados Unidos (Haley *et al.*, 2016). En México, existe presencia documentada de serotipos de *Salmonella enterica* como Anatum, London, Reading y Kentucky que han sido aislados e identificados a partir de fuentes animales (Contreras-Soto *et al.*, 2019). Esto soporta la idea de una potencial transmisión del patógeno entre animales y humanos.

Por otro lado, el 15.6% del total de genomas analizados provinieron solamente de aislamientos a partir de carne molida. Los serotipos identificados en este grupo corresponden a Typhimurium y Muenster. Este resultado sugiere que la contaminación de la carne con este patógeno puede tener también origen fecal, tal y como ya ha sido documentado en estudios previos (Delgado *et al.*, 2018; Gragg *et al.*, 2013).

Salmonella Typhimurium es reconocida por su relevancia epidemiológica (Galmor *et al.*, 2014) y por presentar variantes diversas, una de estas es la *Salmonella* Typhimurium ST 34, conocida por contener genes de resistencia antimicrobianos (Lou *et al.*, 202) y que se encuentra difundida por diversos países de Asia, América, Europa y Oceanía y ha sido aislada a partir de fuentes humanas y animales (Biswas *et al.*, 2019). Además, este serotipo es considerado un especialista en la colonización intestinal de los animales (Bäumer *et al.*, 2011). El hecho de lograr la colonización del intestino de los bovinos facilita su diseminación en la cadena productiva, por la ruta fecal-oral; esto resalta entonces las características de la bacteria como un patógeno transmisible por alimentos.

Es de especial importancia, también, tener en cuenta el hecho de que los genomas de las cepas del serotipo Typhimurium, con excepción de uno, portaban una isla genómica de resistencia (SGI1, del inglés *Salmonella* Genomic Island 1) (Figura 5), la cual alberga genes como *aadA2*, *blaCARB-2*, *floR*, *sul1*, *qacEDelta1*, y *tetG* (Brunelle *et al.*, 2017). Estos genes le confieren un fenotipo de resistencia contra múltiples antimicrobianos (MDR). Este último resultado parece condicionar la señal filogenética que se observa en la agrupación de los genomas de *Salmonella* Typhimurium presentes en la Figura 5, los cuales formaron dos subclados con un 100% de soporte estadístico. Uno de esos subclados está conformado por la cepa que carece de la SGI1 y el otro, contiene el resto de las cepas que sí portan esta isla. La amplia distribución de la SGI1 entre las cepas del serotipo Typhimurium sugiere que esta característica genómica podría conferir ventajas adaptativas en relación con cepas que carecen de ella. De hecho, el perfil de MDR de la cepa Typhimurium DT104, la cual comparte características genómicas y fenotípicas con las cepas aquí estudiadas, es considerado como uno de los factores claves de su amplia diseminación a escala global (Leekitcharoenphon *et al.*, 2016).

También, es de especial importancia tener en cuenta el hecho de que las cepas del serotipo Typhimurium aquí obtenidas, son portadoras del plásmido de virulencia (pSLT), que le confiere al patógeno la capacidad de provocar infecciones invasivas (de Jong *et al.*, 2012). Si bien, este resultado, no parece manifestarse en la filogenia de la Figura 5, es importante en situaciones donde haya condiciones para el desarrollo de este tipo de infecciones, ya que le aseguran al patógeno un ambiente propicio para la invasión, diseminación y proliferación.

También encontramos, dentro del clado de genomas de cepas de *Salmonella* Typhimurium una cepa que aparece alejada del resto y presentó al momento de la serotificación la fórmula antigénica: I4,[5],12:i:-, esto indica que esta cepa en particular carece de la segunda fase flagelar del antígeno H (producida por el gen *fljB*) por lo que es considerada una variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium. Esta variante monofásica aumenta cada vez más su presencia alrededor del mundo (Bugarel *et al.*, 2012).

La cercanía mostrada por genomas de los serotipos Muenster y Give, se debe a que estos serotipos comparten diversos factores de virulencia necesarios para la colonización intestinal como las adhesinas bacterianas fimbriales del tipo 1 que son expresadas por los genes *fimACDFHIWYZ*, y también, proteínas de adhesión, que son codificadas por los genes *misL*, *ratB*, *shdA* y *sinH*. Asimismo, comparten factores de respuesta al estrés, como el choque térmico que es producido por el gen *rpoH* y de respuesta de tolerancia a la acidez que es producida por los genes *rpoS* y *adA* (Delgado *et al.*, 2018).

Otro resultado de gran relevancia es que el árbol de la Figura 5 evidencia una escasa variación intra-serotipos, ya que las cepas de un mismo serotipo fueron genéticamente cercanas, y aunque los serotipos predominantes como Anatum, Reading y Typhimurium se dividieron en varios subgrupos, estos son cercanos genéticamente. Esta diversidad reducida de serotipos puede deberse a factores tales como la presencia diversificada de genes de resistencia y/o plásmidos en las cepas (Delgado *et al.*, 2018). Entre serotipos tampoco se observó una variación pronunciada, como se detalló anteriormente, la Figura 5 muestra 2 grandes clados, uno con mayor número de genomas (n=65) que el otro (n=12).

En contraste a lo anterior, la representación relativa de los serotipos en los dos años de muestreo sí presentó una variación considerable, porque, con excepción del genoma de *Salmonella* Typhimurium monofásica que provino de una fuente y año diferente al resto de genomas, en el resto de los serotipos descritos en el Cuadro 3, no existe otro que se haya aislado en ambos años de muestreo.

Esto suele ser característico de *Salmonella*, toda vez que el patógeno muestra una persistencia y un comportamiento estacionales, particularmente cuando ocurren altas temperaturas y precipitaciones, como es el caso de las regiones tropicales y

subtropicales (Liu *et al.*, 2018). En el estudio desarrollado por Palós *et al.*, (2020) los resultados también mostraron un aumento en el número de aislamientos de *Salmonella* dentro de meses cálidos. De hecho, el porcentaje en el aislamiento del patógeno puede estar determinado por temporada del año, región geográfica y sistema de producción (Webb *et al.* 2017).

Por otro lado, resulta poco probable que las cepas aisladas a partir de nódulos linfáticos hayan ingresado y alcanzado este tejido por vía intestinal. La presencia del patógeno en el intestino, provocaría una gastroenteritis y como consecuencia una diarrea que terminaría eliminando al patógeno por las heces (Bäumer *et al.*, 2011), por lo que, un eventual ingreso por vía intestinal le representa un callejón sin salida a estas cepas de *Salmonella* no tifoidea. Para poder traspasar la barrera intestinal, las cepas de *Salmonella* requieren de la presencia en su genoma de elementos como el plásmido de virulencia de *Salmonella* (*spv*), que es necesario para la supervivencia dentro de macrófagos y la posterior diseminación sistémica por la vía linfática (Bäumer *et al.*, 1998). En una revisión de los metadatos, los genomas de las cepas de *Salmonella enterica* provenientes de nódulos linfáticos carecen del referido plásmido (García *et al.*, 2019). Además, las cepas portadoras de *spv* causan infecciones invasivas graves (Galmor *et al.*, 2014) y no sería lógico que los bovinos que presentaran signos de enfermedad, fueran aprobados para matanza y posterior consumo humano. En el estudio de Olafson *et al.* (2016) se concluye que *Salmonella enterica* tiene una vía de entrada transdérmica al sistema linfático de los bovinos, como consecuencia de una prolongada exposición a las picaduras de *Haematobia irritans*, que previamente fueron contaminadas con cepas de *Salmonella enterica*. Esto, se hace mucho más evidente durante las épocas cálidas, cuando este tipo de insectos proliferan; esto podría ser un factor influyente de la variación observada de los serotipos encontrados a lo largo del tiempo (Figura 5).

III.c Filogenia muestra persistencia de cepas de *Salmonella enterica* en diferentes fuentes

El árbol filogenético presentado en la Figura 6, muestra cercanía genética de los genomas de cepas obtenidas en el presente trabajo con aquellas obtenidas a partir de distintos alimentos (vegetales, carne molida, pollo, etc.), en un período mayor a los 10

años. Con este árbol se pone en evidencia la capacidad del patógeno para diseminarse y persistir en diversos nichos ecológicos, además muestra su aptitud para dispersarse en las diversas cadenas alimenticia. Ejemplos de esta persistencia se observan dentro de los serotipos Kentucky, Fresno, London, Reading y Typhimurium. En México, Contreras-Soto *et al*, (2019) documentaron la presencia de cepas de *Salmonella enterica*, serotipos Typhimurium, Anatum, Reading, London, Give, Muenster, y Kentucky; que fueron aisladas a partir de fuentes animales, vegetales y el ambiente en el periodo de 1968 a 2018.

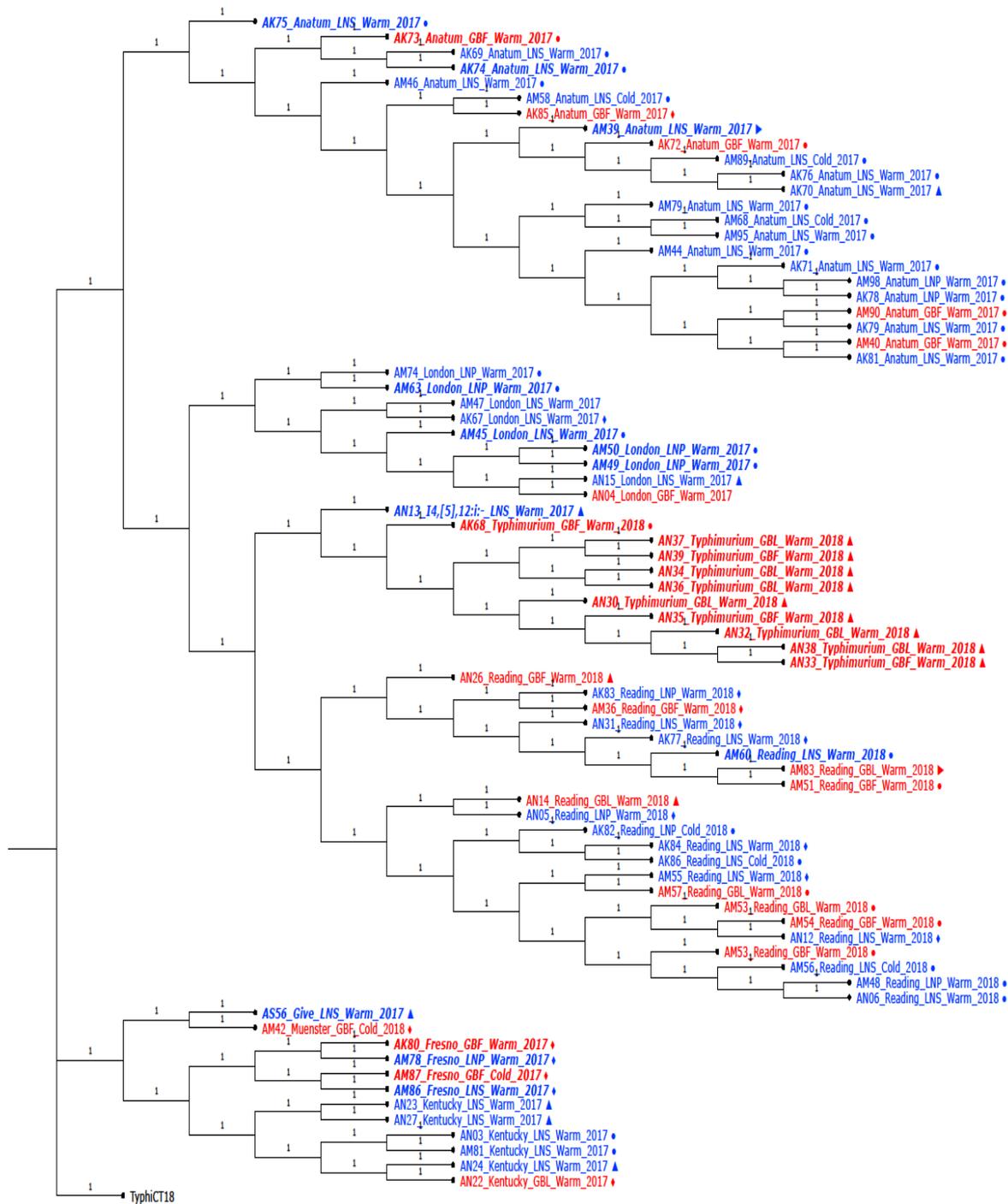
Por otro lado, al agregar genomas de diversos orígenes al árbol filogenético, se encontró un comportamiento polifilético, es decir, que no parecen provenir de un ancestro común. Este fenómeno ha sido reportado en serotipos de *Salmonella enterica* como Newport (Cao *et al.*, 2013).

En la Figura 6 se aprecia un comportamiento polifilético en serotipos como Fresno, Reading, Give y Kentucky, observándose la asociación entre genomas de cepas de los serotipos Fresno-Anatum provenientes de fuentes vegetales con bovinos. También, los genomas de los serotipos Reading-Muenster provenientes de bovinos se asocian con casos clínicos en humanos. Lo anterior sugiere que las cepas de estos serotipos que son polifiléticas y presentan una diferenciación que está determinada por el nicho ecológico. En el resto de los serotipos donde se observa un comportamiento polifilético, no parece haber una asociación entre fuentes o entre áreas geográficas. El comportamiento polifilético en cepas de *Salmonella enterica* fue reportado en el estudio desarrollado por Pornsukarom *et al.* (2018), quienes aplicaron análisis filogenéticos a cepas de *Salmonella* y observaron la presencia de genomas únicos que no agruparon en los clados principales de sus respectivos serotipos, la diferencia fue atribuida a la fuente de donde se obtuvieron las cepas (ambiente, animal y vegetal).

Otro resultado importante obtenido del análisis de la filogenia del árbol de la Figura 6, es la evidente cercanía genética que muestran los genomas de cepas de todos los serotipos encontrados en este estudio con aquellos que provinieron de casos clínicos en humanos.

Esto acentúa el rol de los bovinos como diseminadores de *Salmonella*, que es liberada al medio ambiente, agua y alimentos y que pueden afectar a otros animales dentro de

las granjas (Ferrari *et al.*, 2019). Además de lo anterior, estos resultados sitúan a los bovinos como reservorios de cepas de *Salmonella* capaces de afectar al humano.



20

Figura 5. Árbol de máxima verosimilitud basado en polimorfismos de un solo nucleótido, generado con RAxML bajo el modelo evolutivo GTR+ Γ y con un remuestreo (bootstrapping) de 100, elaborado con PhaMe. Muestra 77 cepas de *Salmonella enterica* provenientes de carne molida (rojo) y nódulos linfáticos (azul). En los serotipos Anatum, London, Reading, Fresno y Kentucky se observa clonalidad entre cepas sin importar su origen. Por el perfil su de resistencia a antimicrobianos, las cepas señaladas con punto (●) son pansusceptibles, con rombo (◆) monoresistentes, flecha derecha (▶) biresistentes y flecha arriba (▲) multiresistentes.

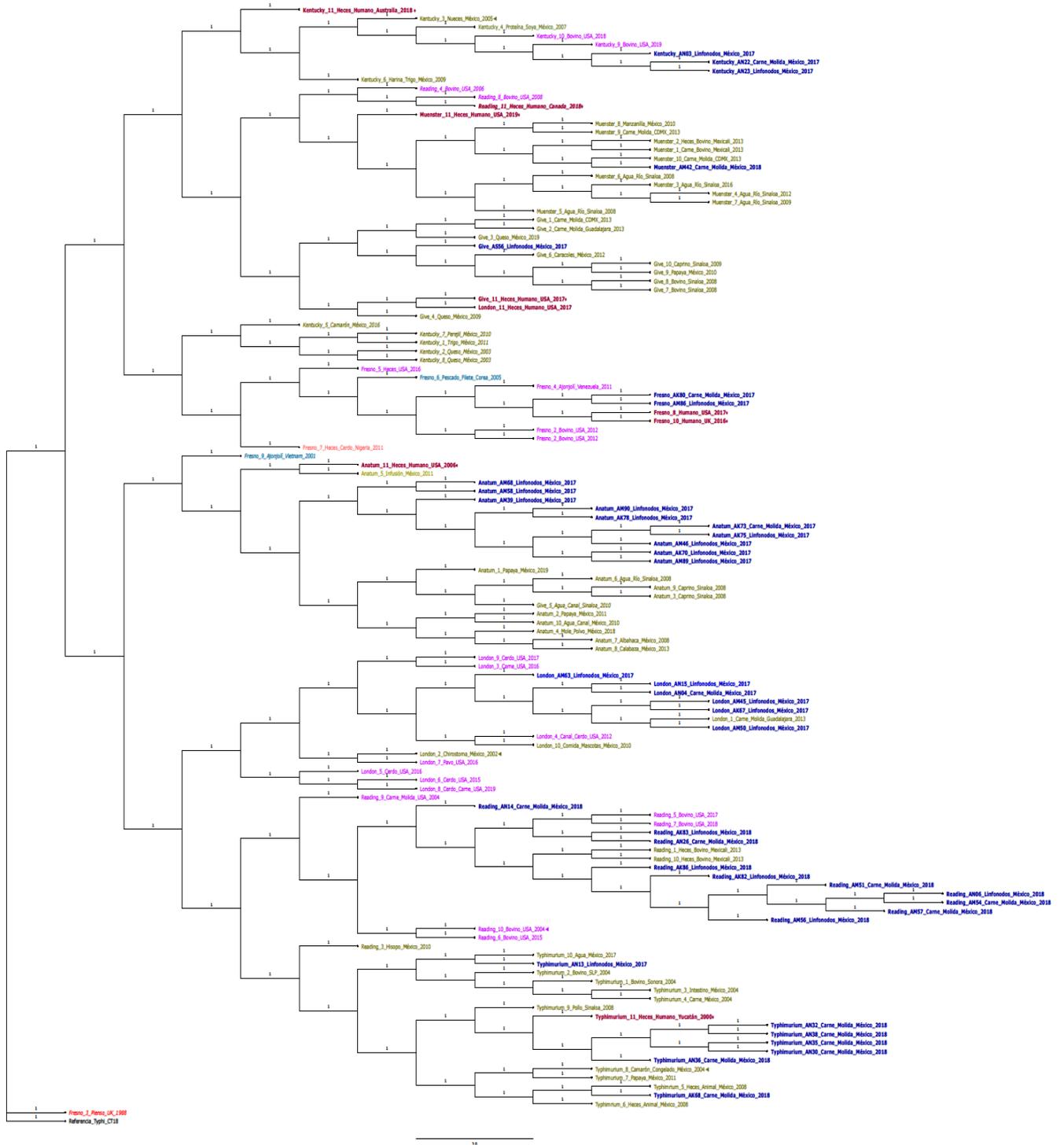


Figura 6. Árbol de máxima verosimilitud basado en polimorfismos de un solo nucleótido bajo el modelo evolutivo GTR+ Γ . Muestra 126 cepas de *Salmonella enterica* provenientes de diversas fuentes. Las cepas provenientes de origen clínico en humanos se señalan con un rombo (◆). Las cepas que muestran comportamiento polifilético se encuentran escritas en cursivas. Las cepas de origen clínico en humanos que son clonales con cepas provenientes de bovinos se marcan con flecha (◄).

IV. Conclusiones

El presente trabajo demostró que la inclusión de nódulos linfáticos de bovinos aparentemente sanos a la carne molida, constituye una fuente importante de contaminación con cepas de *Salmonella enterica* de importancia clínica a este producto puede significar un riesgo a la salud pública.

V. Anexos

Anexo 1.

Metadatos y calidad de los 77 genomas de cepas de *Salmonella enterica* utilizados en la elaboración del análisis de Pangenoma y para la construcción del análisis filogenético mostrado en la Figura 5.

Genoma	Serotipo	Biomuestra	Fuente	Núm. Contings	Tamaño del genoma	%de GC	N50	L50
AK67	London	SAMN12345825	Linfonodo	79	4'625,233	52.26	100,798	15
AK68	Typhimurium	SAMN12345826	Linfonodo	94	4'878,116	52.20	107,374	12
AK69	Anatum	SAMN12345827	Linfonodo	59	4'679,792	52.15	162,707	9
AK70	Anatum	SAMN12345828	Linfonodo	69	4'680,675	52.16	154,880	9
AK71	Anatum	SAMN12345829	Linfonodo	69	4'678,404	52.16	163,923	10
AK72	Anatum	SAMN12345830	Linfonodo	79	4'678,539	52.17	139,371	10
AK73	Anatum	SAMN12345831	Linfonodo	44	4'684,600	52.14	405,090	5
AK74	Anatum	SAMN12345832	Linfonodo	44	4'676,409	52.14	405,090	5
AK75	Anatum	SAMN12345833	Linfonodo	52	4'688,309	52.15	303,902	6
AK76	Anatum	SAMN12345834	Carne Molida	89	4'686,870	52.16	137,319	11
AK77	Reading	SAMN12345835	Linfonodo	92	4'820,039	52.24	112,920	14
AK78	Anatum	SAMN12345836	Linfonodo	74	4'685,760	52.15	182,618	9
AK79	Anatum	SAMN12345837	Linfonodo	81	4'679,103	52.16	152,395	11
AK80	Fresno	SAMN12345838	Carne Molida	101	4'835,458	52.18	92,473	16
AK81	Anatum	SAMN12345839	Carne Molida	55	4'680,836	52.15	223,240	7
AK82	Reading	SAMN12345840	Linfonodo	83	4'821,481	52.23	156,799	12
AK83	Reading	SAMN12345841	Linfonodo	80	4'820,921	52.23	143,269	13
AK84	Reading	SAMN12345842	Linfonodo	61	4'788,193	52.24	240,743	7
AK85	Anatum	SAMN12745979	Linfonodo	55	4'686,724	52.14	273,882	6
AK86	Reading	SAMN12745980	Carne Molida	90	4'792,009	52.26	144,550	10
AM36	Reading	SAMN12745981	Linfonodo	56	4'817,507	52.23	265,489	7
AM39	Anatum	SAMN12745982	Linfonodo	53	4'769,776	52.10	236,074	7
AM40	Anatum	SAMN12745983	Linfonodo	28	4'677,925	52.14	396,448	5
AM42	Muenster	SAMN12745984	Linfonodo	41	4'755,413	52.13	316,789	6
AM44	Anatum	SAMN12745985	Carne Molida	36	4'678,081	52.14	269,637	6
AM45	London	SAMN12745986	Linfonodo	61	4'637,813	52.24	401,391	5
AM46	Anatum	SAMN12745987	Carne Molida	40	4'677,770	52.14	288,562	7
AM47	London	SAMN12745988	Carne Molida	42	4'662,895	52.21	226,033	6

AM48	Reading	SAMN12745989	Carne Molida	62	4'808,815	52.24	167,891	9
AM49	London	SAMN12745990	Linfonodo	42	4'626,147	52.25	307,420	6
AM50	London	SAMN12745991	Linfonodo	41	4'627,332	52.25	406,101	5
AM51	Reading	SAMN12745992	Linfonodo	73	4'799,814	52.24	168,863	10
AM52	Reading	SAMN12745993	Linfonodo	57	4'808,258	52.24	256,621	7
AM53	Reading	SAMN12745994	Linfonodo	57	4'808,916	52.24	231,062	8
AM54	Reading	SAMN12745995	Linfonodo	66	4'808,055	52.15	168,388	11
AM55	Reading	SAMN12745996	Carne Molida	79	4'804,934	52.25	74,808	12
AM56	Reading	SAMN12856886	Carne Molida	57	4'808,645	52.24	238,893	7
AM57	Reading	SAMN12856887	Carne Molida	60	4'808,398	52.24	175,964	9
AM58	Anatum	SAMN15872724	Carne Molida	82	4'624,165	52.28	96,769	13
AM60	Reading	SAMN12856888	Linfonodo	67	4'818,500	52.23	175,964	9
AM63	London	SAMN12856889	Carne Molida	49	4'677,647	52.14	226,033	6
AM68	Anatum	SAMN12856890	Linfonodo	37	4'682,568	52.14	318,125	6
AM74	London	SAMN12856891	Linfonodo	44	4'666,398	52.21	405,969	5
AM78	Fresno	SAMN12856892	Linfonodo	46	4'835,008	52.17	407,875	5
AM79	Anatum	SAMN12856893	Linfonodo	29	4'678,745	52.45	414,143	5
AM81	Kentucky	SAMN15872725	Linfonodo	111	4'739,128	52.33	77,864	20
AM83	Reading	SAMN12856894	Carne Molida	81	4'813,087	52.23	144,046	13
AM86	Fresno	SAMN12856895	Linfonodo	45	4'832,960	52.17	325,551	5
AM87	Fresno	SAMN12856896	Carne Molida	46	4'832,753	52.17	267,949	5
AM89	Anatum	SAMN12856897	Linfonodo	42	4'678,188	52.14	242,888	8
AM90	Anatum	SAMN12856898	Carne Molida	45	4'677,506	52.15	245,620	6
AM95	Anatum	SAMN12856899	Linfonodo	31	4'687,917	52.14	405,090	5
AM98	Anatum	SAMN12856900	Linfonodo	51	4'677,807	52.15	241,362	7
AN03	Kentucky	SAMN15872719	Linfonodo	110	4'749,098	52.33	71,206	22
AN04	London	SAMN15872720	Carne Molida	88	4'584,195	52.36	96,311	14
AN05	Reading	SAMN12856901	Linfonodo	52	4'775,524	52.25	201,879	8
AN06	Reading	SAMN12856902	Linfonodo	57	4'808,339	52.24	175,964	8
AN12	Reading	SAMN12857423	Linfonodo	59	4'808,504	52.24	175,964	8

AN13	1,4,[5],12:i-	SAMN12857424	Linfonodo	104	5'096,086	50.56	181,603	10
AN14	Reading	SAMN12857425	Carne Molida	48	4'773,869	52.25	293,394	6
AN15	London	SAMN12857426	Linfonodo	74	4'626,552	52.24	405,207	5
AN22	Kentucky	SAMN12857427	Carne Molida	50	4'806,748	52.16	200,196	8
AN23	Kentucky	SAMN12857428	Linfonodo	48	4'807,080	52.17	213,892	8
AN24	Kentucky	SAMN12857429	Linfonodo	59	4'807,495	52.17	148,942	10
AN26	Reading	SAMN12857430	Carne Molida	84	4'822,495	52.23	118,532	12
AN27	Kentucky	SAMN12857431	Linfonodo	51	4'806,590	52.16	113,043	8
AN30	Typhimurium	SAMN12857432	Carne Molida	56	4'915,760	52.14	225,558	6
AN31	Reading	SAMN12857433	Linfonodo	79	4'822,015	52.24	108,191	11
AN32	Typhimurium	SAMN15872721	Carne Molida	144	4'874,562	52.27	56,087	26
AN33	Typhimurium	SAMN15872722	Carne Molida	139	4'877,279	52.25	62,049	24
AN34	Typhimurium	SAMN12857434	Carne Molida	73	4'929,918	52.12	196,601	9
AN35	Typhimurium	SAMN12857435	Carne Molida	73	4'929,647	52.12	170,627	11
AN36	Typhimurium	SAMN12857436	Carne Molida	58	4'929,871	52.12	204,597	7
AN37	Typhimurium	SAMN12857437	Carne Molida	53	4'930,120	52.12	223,108	5
AN38	Typhimurium	SAMN15872723	Carne Molida	140	4'873,472	52.22	61,828	22
AN39	Typhimurium	SAMN12857438	Carne Molida	59	4'930,447	52.12	196,601	8
AS56	Give	SAMN12857439	Linfonodo	29	4'680,120	52.08	409,925	4

Anexo 2. Listado de datos de 87 genomas de *Salmonella enterica* tomados de la base pública de NCBI. Los 40 genomas restantes para completar 127 y que son mostrados en la Figura 6 fueron tomados del anexo 1 y se resaltan con color rojo.

No	Serotipo	Biomuestra	Fuente
1	Anatum	SAMN02709277	Papaya
2	Anatum	SAMN02352684	Papaya
3	Anatum	SAMN10261437	Caprina
4	Anatum	SAMN12984961	Mole en Polvo
5	Anatum	SAMN02345140	Té
6	Anatum	SAMN10261271	Agua de río
7	Anatum	SAMN02698087	Albahaca
8	Anatum	SAMN02678820	Calabaza
9	Anatum	SAMN10261435	Caprina
10	Anatum	SAMN02344940	Agua de canal
11	Anatum	SAMN02716856	Clínica-Humano
12	Reading	SAMN03577670	Bovino
13	Reading	SAMN03577670	Bovino
14	Reading	SAMN02344946	Hisopo-Humano
15	Reading	SAMN02742081	Bovino
16	Reading	SAMN08472586	Bovino
17	Reading	SAMN04316385	Bovino
18	Reading	SAMN09489526	Bovino
19	Reading	SAMN09954719	Bovino
20	Reading	SAMN02646881	Carne molida
21	Reading	SAMN02908547	Bovino
22	Reading	SAMN12767583	Clínica-Humano
23	Typhimurium	SAMN10076455	Carne
24	Typhimurium	SAMN10076456	Bovino
25	Typhimurium	SAMN11806968	Intestino-Humano
26	Typhimurium	SAMN11806976	Carne
27	Typhimurium	SAMN02846093	Bovino
28	Typhimurium	SAMN02846095	Bovino
29	Typhimurium	SAMN02847330	Papaya
30	Typhimurium	SAMN02845563	Camarón congelado
31	Typhimurium	SAMN10261463	Pollo
32	Typhimurium	SAMN09638224	Agua
33	Typhimurium	SAMN03795199	Clínica-Humano
34	London	SAMN03577653	Carne molida
35	London	SAMN02845131	<i>Chirostoma</i>
36	London	SAMN06256214	Carne
37	London	SAMN02314178	Cerdo
38	London	SAMN05274322	Cerdo
39	London	SAMN04160883	Cerdo

40	London	SAMN06161169	Pavo
41	London	SAMN12842784	Cerdo
42	London	SAMN06754686	Cerdo
43	London	SAMN02918770	Juete para mascotas
44	London	SAMN07554941	Clínica-Humano
45	Kentucky	SAMN02918789	Trigo
46	Kentucky	SAMN02845340	Queso
47	Kentucky	SAMN02844288	Nueces
48	Kentucky	SAMN02844541	Proteína de Soya
49	Kentucky	SAMN04606487	Camarón
50	Kentucky	SAMN02678777	Harina de Trigo
51	Kentucky	SAMN02344887	Perejil
52	Kentucky	SAMN02845339	Queso
53	Kentucky	SAMN13624454	Bovino
54	Kentucky	SAMN09866428	Bovino
55	Kentucky	SAMN08784247	Clínica-Humano
56	Give	SAMN03577640	Carne molida
57	Give	SAMN03577642	Carne molida
58	Give	SAMN02844462	Queso
59	Give	SAMN02843916	Queso
60	Give	SAMN10261416	Agua de canal
61	Give	SAMN02844094	Caracoles
62	Give	SAMN10261464	Bovino
63	Give	SAMN10261477	Bovino
64	Give	SAMN02344956	Papaya
65	Give	SAMN10261438	Cabra
66	Give	SAMN08395761	Clínica-Humano
67	Fresno	SAMN10292989	Bovino
68	Fresno	SAMN09791879	Bovino
69	Fresno	SAMN03569078	Alimento animal
70	Fresno	SAMN02847290	Ajonjolí
71	Fresno	SAMN05001784	Clínica
72	Fresno	SAMN02844214	Pescado
73	Fresno	SAMN07135266	Cerdo
74	Fresno	SAMN09009112	Clínica
75	Fresno	SAMN02845045	Ajonjolí
76	Fresno	SAMN09504414	Clínica-Humano
77	Muenster	SAMN03577645	Bovino
78	Muenster	SAMN03577663	Bovino
79	Muenster	SAMN10261301	Agua de río
80	Muenster	SAMN10261298	Agua de río
81	Muenster	SAMN10261300	Agua de río
82	Muenster	SAMN10261304	Agua de río
83	Muenster	SAMN10261299	Agua de río
84	Muenster	SAMN02483558	Manzanilla

85	Muenster	SAMN02918851	Juguete para mascotas
86	Muenster	SAMN02918779	Comida para mascotas
87	Muenster	SAMN11435804	Clínica-Humano

Referencias

1. Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal*, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>.
2. Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
3. Arthur TM, Brichita-Harhay DM, Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Wells JE, Shackelford SD, Wheeler TL, Koochmaraie M. (2008) Prevalence and characterization of *Salmonella* in bovine lymph nodes potentially destined for use in ground beef. *Journal of Food Protection*, 71:1885-1688. <https://doi:10.4315/0362-028x-71.8.1685>
4. Ayala D, Nightingale K, Narvaez-Bravo C, Brashears M. M. (2017). Molecular characterization of *Salmonella* from beef carcasses and fecal samples from an integrated feedlot and abattoir in Mexico. *Journal of Food Protection*. 80:1964-1972. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-157>.
5. Barreto M, Castillo-Ruiz M, & Retamal P. (2016). *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 547-557. <https://dx.doi.org/10.4067/S071610182016000500010>
6. Bäumler A.J, Tsois R.M, Ficht T.A, and L. Garry Adam L.G. (1998). Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*. 66(10):4579-87. PMID: 9746553. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.10.4579-4587.1998>
7. Bäumler, A.J., Winter, S.E., Thiennimitr, P. and Casadesús, J. (2011), Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environmental Microbiology Reports*, 3: 508-517. <https://doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00242.x>
8. Biswas S, Li Y, Elbediwi M and Yue M. Emergence and Dissemination of mcr-Carrying Clinically Relevant *Salmonella* Typhimurium Monophasic Clone ST34. *Microorganisms* 2019, 7, 298; <https://doi:10.3390/microorganisms7090298>
9. Bohaychuk, V. M., Gensler, G. E., & Barrios, P. R. (2011). Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 52(10), 1095–1100.
10. Bolger A. M, Lohse M, Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer form Illumina sequence data. *Bioinformatics*. Volume 30, Issue 15, 1 august 2014, Pages 2114–2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
11. Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Kalchayanand, N., & Koochmaraie, M. (2009). Prevalence and characterization of salmonellae in commercial ground beef in the United States. *Applied and environmental microbiology*, 75(7), 1892–1900. <https://doi.org/10.1128/AEM.02530-08>

12. Brawn, L. C., Hayward, R. D., & Koronakis, V. (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell host & microbe*, 1(1), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.02.001>
13. Brunelle BW, Bearson BL, Bearson SMD, Casey TA. 2017. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates are resistant to antibiotics that influence their swimming and swarming motility. *mSphere* 2:e00306-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00306-17>.
14. Bugarel, M. Granier, S.A. Bonin, E. Vignaud, M.L. Roussel, S. Fach, P. Brisabois A. 2012. Genetic diversity in monophasic (1,4,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and in non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* S. Typhimurium. *Food Research International* 45 1016–1024. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.057.
15. Bugarel, M., Cook, P. W., den Bakker, H. C., Harhay, D., Nightingale, K. K., & Loneragan, G. H. (2019). Complete Genome Sequences of Four *Salmonella enterica* Strains (Including Those of Serotypes Montevideo, Mbandaka, and Lubbock) Isolated from Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle. *Microbiology resource announcements*, 8(2), e01450-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01450-18>
16. Cabrera-Diaz, E., Barbosa-Cardenas, C. M., Perez-Montaña, J. A., Gonzalez-Aguilar, D., Pacheco-Gallardo, C., & Barba, J. (2013). Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of salmonella in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *Journal of food protection*, 76(12), 2004–2010. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-109>
17. Cao G, Meng J, Strain E, Stones R, Pettengill J, Shaohua Z, McDermott P, Brown E, Allard M. (2013) Phylogenetics and differentiation of Salmonella Newport lineages by whole genome sequencing. *Plos One*. 8: e55687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055687>
18. Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff G. (1998). Comparison of water wash, trimming, and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *Journal of Food Protection*. 61: 823-828. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.7.823>
19. Castillo A, Lucia LM, Goodson KJ, Savell JW, Acuff G. (1999). Decontamination of beef carcass Surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. *Journal of Food Protection*. 62: 146-151. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.2.146>
20. Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2017. (documento consultado en internet). Consultado el 29 de abril de 2019. Disponible en <https://data.cdc.gov/NNDSS/NNDSS-Table-I-infrequently-reported-notifiable-dis/45b4-9j7u>.
21. Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2018. *Salmonella*. Mayo 2018. Consultado el 30 de abril de 2019. Disponible en <https://www.cdc.gov/salmonella/>

22. Center for Disease Control and Prevention (CDC) 2019. Reporte final de brote. Consultado en internet el 20 de enero de 2020. Disponible en <https://www.cdc.gov/salmonella/dublin-11-19/index.html>
23. Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., & Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Scientific reports*, 6, 24373. <https://doi.org/10.1038/srep24373>
24. Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez, Q. C., Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of *Salmonella* in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e540>
25. Cunha-Neto A, Silva-Castro V, Carvalho L. A, Rodrigues D.P, Borges-Mano S, de Souza E.E, Figueiredo and Conte-Junior C.A. (2017). Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolated from fresh beef processing and chilled fresh beef samples produced and marketed in the metropolitan region of Cuiabá, in the State of Mato Grosso, Brazil. *Poultry Science* 0:1–9 <https://doi.org/10.3382/ps/pex406>.
26. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ (2012) Host–Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLOS Pathogens* 8(10): e1002933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002933>
27. Delgado-Suárez EJ, Selem-Mojica N, Ortiz-lopez R, Genreyes WA, Allard MW, Barona-Gómez F, Rubio-Lozano MS. (2018). Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*. *Scientific Reports*. 8: 9864. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28169-4>.
28. den Bakker C.H, Moreno A. I, Govoni G, Craig A Cummings C. A, Ranieri M. L, Degoricija L, Hoelzer K, Rodriguez-Rivera L. D, Brown S, Bolchacova E, Furtado M. R and Wiedmann M. (2011). Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC Genomics*. 12:425 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-425>
29. Desai PT, Porwollik S, Long F, Cheng P, Wollam A, Clifton S, Weinstock GM, McClelland M. 2013. Evolutionary genomics of the *Salmonella enterica* subspecies. *mBio*4. (2):e00579-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00579-12>
30. Dilucca M, Cimini G, Giansanti A. (2018). Essentiality, conservation, evolutionary pressure and codon bias in bacterial genomes. *Gene*, Volume 663, 178-188, ISSN 0378-1119, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.017>.
31. Fàbrega A. and Vila J. (2013) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *American Society of Microbiology*. <https://doi:10.1128/CMR.00066-12>.
32. Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. 2019. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology* 85:e00591-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>.

33. Foley S.L, Lynne A.M. (2008). Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*. 86: E173–87. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0447>
34. Frech, G. and Schwarz, S. (2000) Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. *Journal Applied Microbiology* 89, 633–641. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01160.x>
35. Galán, J. E., & Curtiss, R., 3rd (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(16), 6383–6387. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6383>
36. Gal-Mor O, Erin C. Boyle E.C and Grassl G.A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers Microbiology*. 4;5: 391. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>.
37. García J, Paniagua J, Pelayo R, Isibasi A, Kumate J. (1992) Factores de virulencia de *Salmonella Typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas. *Revista Salud pública de México*. Núm. 3-. p. 262-267. ISSN 1606-7916. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5499/5863>
38. García MAV, Palós GTB, Ponce HEA, Ruíz LFA, Hernández PCF, Soberanis RO, Rubio LMS y Delgado SEJ. (2019) GENÓMICA COMPARATIVA DEL PERFIL DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS A PARTIR DE DIVERSAS FUENTES DE ORIGEN BOVINO en la III Reunión de Genómica Pecuaria realizada en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
39. Garrido V, Sanchez S, San Román B, Fraile L, Migura-García and Grilló M.J. (2019). *Salmonella* Infection in Mesenteric Lymph Nodes of Breeding Sows. *Foodborne Pathogens and Disease*. Volume XX, Number XX. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2708>.
40. Garza-García J.A, Rubio-Lozano M.S, Wachter-Rodarte M. C, Navarro Ocaña A, Hernández-Castro R, Xicohtencatl-Cortes J, Delgado-Suárez E J, (2020) Frecuencia de contaminación y de serotipos de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* en una operación integrada de matanza y deshuese de bovinos. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 1(4):971-990. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5111>
41. Gerlach R. G, Hensel M. 2007. *Salmonella* Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 120, 317–327 (2007) <https://doi.org/10.2376/0005-9366-120-317>.
42. Ginocchio, C., Pace, J., & Galán, J. E. (1992). Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 5976–5980. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5976>.

43. Gragg S. E, Loneragan G. H, Nightingale K. K, Brichta-Harhay D. M, Ruiz H, Elder J. R, Garcia L. G, Miller M. F, Echeverry A, Ramírez Porrás R. G, Brashears M. M. (2013). Substantial within-Animal Diversity of *Salmonella* Isolates from Lymph Nodes, Feces, and Hides of Cattle at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 (15) 4744-4750; <https://doi.org/10.1128/AEM.01020-13>
44. Grimont P.A.D, Weill F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Disponible en: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>.
45. Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S, Buchmeier NA, Fierer J. (1995). Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clinical Infectious Diseases*. 21(2):S146–51. https://doi.org/10.1093/clinids/21.supplement_2.s146
46. Gupta, S. K., Sharma, P., McMillan, E. A., Jackson, C. R., Hiott, L. M., Woodley, T., Humayoun, S. B., Barrett, J. B., Frye, J. G., & McClelland, M. (2019). Genomic comparison of diverse *Salmonella* serovars isolated from swine. *PLoS one*, 14(11), e0224518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224518>
47. Haley BJ, Kim SW, Pettengill J, Luo Y, Karns JS, Van Kessel JAS (2016) Genomic and Evolutionary Analysis of Two *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Sequence Types Isolated from Bovine and Poultry Sources in North America. *PLoS one* 11(10): e0161225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161225>
48. Haneklaus AN, Harris KB, Griffin DB, Edrington TS, Lucia LM, Savell JW. (2012). *Salmonella* prevalence in bovine lymph nodes differs among feedyards. *Journal of Food Protection*. 75: 1131-1133. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-530>.
49. Helms, M., Ethelberg, S., Mølbak, K., & DT104 Study Group (2005). International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging infectious diseases*, 11(6), 859–867. <https://doi.org/10.3201/eid1106.041017>
50. Hensel, M, Shea J.E, Bäumler A.J, Gleeson C, Blattner F, and Holden D. W. (1997). Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 179(4):1105-11. <https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1105-1111.1997>.
51. Hoffmann S, Batz MB, Morris Jr JG. (2012). Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*. 75: 1292-1302. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-417>.
52. Holt, K. E., Thomson, N. R., Wain, J., Langridge, G. C., Hasan, R., Bhutta, Z. A., Quail, M. A., Norbertczak, H., Walker, D., Simmonds, M., White, B., Bason, N., Mungall, K., Dougan, G., & Parkhill, J. (2009). Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC genomics*, 10, 36 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-36>.
53. Horstmann, JA, Zschieschang, E, Truschel, T, et al. (2017) Flagellin phase-dependent swimming on epithelial cell surfaces contributes to productive *Salmonella* gut colonisation. *Cellular Microbiology*. 19:e12739. <https://doi.org/10.1111/cmi.12739>.

54. Ilyas, B., Tsai, C. N., & Coombes, B. K. (2017). Evolution of *Salmonella*-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 428. <https://doi:10.3389/fcimb.2017.00428>.
55. Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., & Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microbial ecology*, 62 (3), 487–504. <https://doi:10.1007/s00248-011-9880-1>.
56. Kalchayanand N, Arthur TM, Bosilevac JM, Brichita-Harhay DM, Guerini MN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. (2009). Effectiveness of 1,3-dibromo-5,5 dimethylhydantoin on reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* inoculated fresh meat. *Journal of Food Protection*. 72: 151-156. <https://doi:10.4315/0362-028x-72.1.151>
57. Khen B. K, Lynch O. A, Carroll J, McDowell D. A, Duffy G. (2014). Prevalence and Characteristics of *Salmonella* in the Beef Chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses and Public Health*, 61, 534–536. <https://doi: 10.1111/zph.12099>
58. Khule V, Hensel M. (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: Functions of the type III secretion system of encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi:10.1007/s00018-004-4248-z>.
59. Koohmaraie M, Scanga JA, De la Zerda J, Koohmaraie LT, Beskhlebnaya V, Mai T, Greeson K, Samadpour M. (2012). Tracking the sources of *Salmonella* in ground beef produced from nonfed cattle. *Journal of Food Protection*, 75: 1464-1468. <https://doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-540>.
60. Laing C.R, Whiteside M.D, and Gannon V.P.J (2017) Pan-genome analyses of the species *Salmonella enterica*, and identification of genomic markers predictive for species, subspecies and serovar. *Frontiers of Microbiology*. 8:1345. <https://doi: 10.3389/fmicb.2017.01345>.
61. Lan R, Reeves P.R, Octavia, S. (2009). Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, Genetics and Evolution* 9. 996–1005. <https://doi:10.1016/j.meegid.2009.04.011>.
62. Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill F-X, Baggesen DL, Jun S-R, Ussery DW, Lund O, Crook DW, Wilson DJ, Aarestrup FM. (2016). Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applies Enviromental Microbiology* 82:2516 –2526. <https://doi:10.1128/AEM.03821-15>.
63. Li, M., Malladi, S., Hurd, H. Scott, Goldsmith, T. J, Brichita-Harhay, D. M, & Loneragan, G. H. (2015). *Salmonella* spp. in lymph nodes of fed and cull cattle: Relative assessment of risk to ground beef. *Food control*, 50, 423-434. <https://doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.011>.
64. Liu H, Whitehouse CA and Li B (2018). Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: The Impact on Microbial Quality of Water and Food Safety. *Frontiers Public Health* 6:159. <https://doi: 10.3389/fpubh.2018.00159>

65. Lu S, Manges A.R, Xu Y, Fang F.C, Riley L.W. (1999). Analysis of virulence of clinical isolates of *Salmonella enteritidis* in vivo and in vitro. *Infection and Immunology*. 67(11), 5651-5657. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.5651-5657.1999>
66. Luo, Q., Wan, F., Yu, X., Zheng, B., Chen, Y., Gong, C., Fu, H., Xiao, Y., & Li, L. (2020). MDR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST34 carrying *mcr-1* isolated from cases of bloodstream and intestinal infection in children in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(1), 92–95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz415>
67. Martínez-Chávez L., Cabrera-Díaz E., Pérez-Montaña J. A., Garay-Martínez L.E., Varela-Hernández J.J., Castillo A., Lucia L., Ávila-Novoa M.G., Cardona-López M.A., Gutiérrez-González P., Martínez-González N.E. (2015) Quantitative distribution of *Salmonella spp* and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 210: 149-155. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.016>
68. McClelland M, Sanderson K.E, Clifton S.W, Latreille P, Porwollik S, Sabo A, Meyer R, Bieri T, Ozersky P. (2004). Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nature Genetics*. <https://doi:10.1038/ng1470>
69. Mollenkopf D.F, Mathys D.A, Dargatz D.A, Erdman M.M, Habing G.G, Daniels J.B, Wittum T.E. (2017). Genotypic and epidemiologic characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant *Salmonella enterica* from US beef feedlots. *Preventive Veterinary Medicine* 146 143–149. <http://doi:10.1016/j.prevetmed.2017.08.006>
70. Narvaez-Bravo C, Miller M. F, Jackson T, Jackson S, Rodas-Gonzalez A, Pond K, Echeverry A, Brashears M. M. (2013) *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot and Harvest Plant in Mexico. *Journal of Food Protection*. 76 (5): 786–795. doi: <https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-079>.
71. Nataro J.P, Bopp C.A, Fields P. K, and Strockbine J.B. (2003). *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. *Manual of Clinical Microbiology*. 1. 603-626. <https://doi:10.1128/9781555816728.ch35>.
72. Nde, C. and Logue, C. (2008), Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 215-223. <https://doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03535.x>.
73. Nguyen, S. V., Harhay, D. M., Bono, J. L., Smith, T., Fields, P. I., Dinsmore, B. A., Santovenia, M., Wang, R., Bosilevac, J. M., & Harhay, G. P. (2018). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Montevideo reveals lineage-specific gene differences that may influence ecological niche association. *Microbial genomics*, 4(8), e000202. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000202>
74. Nickelson K. J, Taylor M, Griffin D.B, Savell J.W, Gehring K.B Arnold A.N. (2019) Assessment of *Salmonella* Prevalence in Lymph Nodes of U.S. and Mexican Cattle Presented for Slaughter in Texas. *Journal of Food Protection*. 82 (2): 310–315. <https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-288>

75. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
76. Olafson P.U, Brown T. R, Lohmeyer K. H, Harvey R. B, Nisbet D. J, Loneragan G.H, Edrington T. S. (2016). Assessing Transmission of *Salmonella* to Bovine Peripheral Lymph Nodes upon Horn Fly Feeding. *Journal of Food Protection*. 79 (7): 1135–1142. <https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-414>
77. Organización Mundial de la Salud OMS. (2018 a) Fiebre Tifoidea (documento de internet) última actualización enero de 2018. Consultado el 24 de enero de 2020 Disponible en <https://www.who.int/features/qa/typhoid-fever/es/>
78. Organización Mundial de la Salud OMS. (2018 b) *Salmonella* no Tifoidea última actualización febrero de 2018. Consultado el 24 de enero de 2020 Disponible en [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
79. Overbeek R, Olson R, Pusch G, Olsen G, Davis J, Disz T, Edwards R, Svetlana G, Parello B, Maulik S, Vonstein V, Wattam A, Fangfang X, Stevens R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*. 42: D206-D214. <https://doi:10.1093/nar/gkt1226>
80. Palós G. T, Rubio L. M, Delgado S. E, Guzmán N, Soberanis R. O, Pérez C, Mendez D. (2020). Linfonodos y carne molida de res como reservorios de *Salmonella* spp. de importancia en salud pública. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 11. 795-810. <https://doi:10.22319/rmcp.v11i3.5516>.
81. Park CJ, Andam CP. 2020. Distinct but intertwined evolutionary histories of multiple *Salmonella enterica* subspecies. *mSystems* 5: e00515-19. <https://doi:10.1128/mSystems.00515-19>.
82. Parkhill, J., Dougan, G., James, K. *et al.* (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413, 848–852 <https://doi.org/10.1038/35101607>.
83. Perez-Montaña JA, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, Pacheco-Gallardo C, Campos-Bravo CA, Garcia S, Heredia NL, Cabrera-Diaz E: Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco state, Mexico. *Journal of Food Protection*, 2012, 75: 867-873. <https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-423>.
84. Pornsukarom, S., van Vliet, A.H.M. & Thakur, S. (2018) Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics* 19, 801. <https://doi:10.1186/s12864-018-5137-4>
85. Porwollik S, Wong RM, McClelland M. (2002). Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Science* 99:8956–8961. <https://doi:10.1073/pnas.122153699>

86. Pullinger, G. D., Paulin, S. M, Charleston B, Watson, P. R, Bowen, A. J, Dziva, F, Morgan, E, Villarreal-Ramos, B, Wallis, T. S, & Stevens, M. P. (2007). Systemic translocation of *Salmonella enterica* serovar Dublin in cattle occurs predominantly via efferent lymphatics in a cell-free niche and requires type III secretion system 1 (T3SS-1) but not T3SS-2. *Infection and immunity*, 75(11), 5191–5199. <https://doi:10.1128/IAI.00784-07>
87. Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 141. <https://doi:10.3389/fcimb.2016.00141>
88. Rodriguez-Rivera, L. D, Wright, E. M, Siler, J. D, Elton, M, Cummings, K. J, Warnick, L. D, & Wiedmann, M. (2014). Subtype analysis of *Salmonella* isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human- and bovine-associated subtypes. *Veterinary microbiology*, 170(3-4), 307–316. <https://doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.013>.
89. Rouli L, Merhej V, Fournier E and Raoult D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *Aix Marseille Université, Inserm 1095*, <https://doi:10.1016/j.nmni.2015.06.005>.
90. Sabbagh SC, Forest CG, Lepage C, Leclerc JM, Daigle F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiology Letters*. 305(1):1-13. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x.
91. Saldarriaga O. A; Rugeles M. T. (2001). Genes y plásmidos de la *Salmonella* spp. asociados con virulencia. *Revista colombiana de ciencias pecuarias; Volumen 14 (número 1): páginas 11-19. ISSN-e 0120-0690*.
92. Sandt CH, Fedorka-Cray PJ, Tewari D, Ostroff S, Joyce K, et al. (2013) A Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella* from Humans and Food Animals Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Antimicrobial Susceptibility Patterns. *PLOS ONE* 8(10): e77836. <https://doi:10.1371/journal.pone.0077836>.
93. Shafini, A.B., Son, R., Mahyudin, N.A., Rukayadi, Y., and Tuan Zainazor, T.C. 2017. Prevalence of *Salmonella* spp. in chicken and beef from retail outlets in Malaysia. *International Food Research Journal* 24(1): 437-449.
94. Singh Y, Saxena A, Kumar R and Saxena M, K. 2018. Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. Cap. 3, *Ed. IntechOpen. Book Salmonella - A Re-emerging Pathogen*. <https://doi:10.5772/intechopen>.
95. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica- Sistema Único de Información. Boletín epidemiológico. Número 51, volumen 36. 2020.
96. Smith N. H, Beltran P, Selander R K. (1990). Recombination of *Salmonella* phase 1 flagellin genes generates new serovars. *Journal of Bacteriology*. 172 (5) 2209-2216; <https://doi:10.1128/jb.172.5.2209-2216.1990>.

97. Stecher, B, Robbiani R, Walker A. W, Westendorf A. M, Barthel M, Kremer M, Hardt W, D. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(10), 2177–2189. <https://doi:10.1371/journal.pbio.0050244>.
98. Sundin, G.W. and Bender, C.L. (1996) Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals and plants. *Molecular Ecology* 5, 133–143. <https://doi:10.1111/j.1365-294x.1996.tb00299.x>
99. Tanner J.R, and Kingsley R.A. 2018. Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends in Microbiology*, Vol. 26, No. 12 <https://doi:10.1016/j.tim.2018.06.001>.
100. Tatusov, R.L., Fedorova, N.D., Jackson, J.D. et al. (2003). The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 4, 41. <https://doi:10.1186/1471-2105-4-41>
101. Ugolotti E, Larghero P, Vanni I, Bandettini R, Tripodi G, Melioli G, Di Marco E, Raso A, Biassoni R. (2016). Whole-genome sequencing as standard practice for the analysis of clonality in outbreaks of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a paediatric setting. *Journal Hospital Infection*. 4: 375-381. <https://doi:10.1016/j.jhin.2016.04.003>
102. Varela-Guerrero, J.A, Talavera-Rojas M, Gutiérrez-Castillo A.d.C. et al. (2013). Phenotypic–genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Tropical Animal Health Production* 45, 995–1000. <https://doi:10.1007/s11250-012-0323-x>
103. Vikash S. 2013. *Salmonella* Serovars And Their Host Specificity. *Journal Veterinary Science Animal Husbandry* 1(3): 301. <https://doi:10.15744/2348-9790.1.301>.
104. Vila-Nova, M, Durimel K, La K, Felten A, Bessières P, Michel-Yves M, Mahendra M y Nicolas M. (2019). Genetic and metabolic signatures of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* associated with animal sources at the pangenomic scale. *BMC Genomics*. 20. <https://doi:10.1186/s12864-019-6188-x>.
105. Villalpando-Guzmán S, Vázquez-Quiñones C. R, Natividad-Bonifacio I, Curiel-Quesada E, Quiñones-Ramírez E. I, & Vázquez-Salinas C. (2017). Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 458-466. <https://doi:10.4067/S0716-10182017000500458>
106. Vohra, P., Bugarel, M., Turner, F., Loneragan, G. H., Hope, J. C., Hopkins, J., & Stevens, M. P. (2018). Quantifying the Survival of Multiple *Salmonella enterica* Serovars In Vivo via Massively Parallel Whole-Genome Sequencing To Predict Zoonotic Risk. *Applied and environmental microbiology*, 84(4), e02262-17. <https://doi:10.1128/AEM.02262-17>
107. Vohra, P., Vrettou, C., Hope, J.C. et al. (2019 a). Nature and consequences of interactions between *Salmonella enterica* serovar Dublin and host cells in cattle. *Veterinary Research* 50, 99. <https://doi:10.1186/s13567-019-0720-5>

108. Vohra, P., Chaudhuri, R. R., Mayho, M., Vrettou, C., Chintoan-Uta, C., Thomson, N. R., Hope, J. C., Hopkins, J., & Stevens, M. P. (2019 b). Retrospective application of transposon-directed insertion-site sequencing to investigate niche-specific virulence of *Salmonella* Typhimurium in cattle. *BMC genomics*, 20(1), 20. <https://doi:10.1186/s12864-018-5319-0>.
109. Wattam A.R, Abraham D, Dalay O, Terry L.D, Driscoll T, Gabbard J.L, Gillespie J.J, Gough R, Hix D, Kenyon R, Machi D, Mao C, Nordberg E.K, Olson R, Overbeek R, Pusch G, Shuka M, Schulman J, Stevens R.L, Sulliva D. E, Vonstein V, Warren A, Will R, Wilson M.J, Yoo H.S, Chengdong Z, Zhang Y, Sobral B.W. (2014) PATRIC, the bacterial bioinformatics database and análisis resource. *Nucleic Acids Research*. 42: D581-D591. <https://doi:10.1093/nar/gkt1099>
110. Webb, H. E., Brichta-Harhay, D. M., Brashears, M. M., Nightingale, K. K., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Loneragan, G. H. (2017). *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. *Frontiers in microbiology*, 8, 2214. <https://doi:10.3389/fmicb.2017.02214>.
111. Winfield M.D, AND Groisman E. A. 2013. Evolution and Ecology of *Salmonella*, EcoSal Plus; <https://doi:10.1128/ecosalplus.6.4.6>.
112. Yin, M., Yang, B., Wu, Y., Wang, L., Wu, H., Zhang, T., & Tuohetaribayi, G. (2016). Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovars in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China. *Food control*, 64, 165-172. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2015.12.029>.
113. Yu H, Wang J, Ye J, Tang P, Chu C, Hu S, *et al.* (2006). Complete nucleotide sequence of pscv50, the virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis SCB67. *Plasmid*. 55:145–51. <https://doi:10.1016/j.plasmid.2005.09.001>
114. Zhang, S., Yanlong Yin, Marcus B. Jones, Zhenzhen Zhang, Brooke L. Deatherage Kaiser, Blake A Dinsmore, Collette Fitzgerald, Patricia L. Fields, Xiangyu Deng. (2015) *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genoma sequencing data. *Journal Clinical of Microbiology*, 2015. 53(5): págs. 1685-1692. <https://doi.org/10.1128/JCM.00323-15>