



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Elaboración del “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015-2017, secuenciación de genoma completo y genes de resistencia a antimicrobianos”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Luis Angel Mendoza Torres



Ciudad de México, 2018



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila**

VOCAL: **Profesor: José Adelfo Escalante Lozada**

SECRETARIO: **Profesor: Cindy Fabiola Hernández Pérez**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Aleida Mina Cetina**

2° SUPLENTE: **Profesor: Alberto Ortega Vázquez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE MODIFICADOS. SENASICA-SAGARPA. CARRETERA FEDERAL
PACHUCA-MÉXICO KM 37.5, CENTRO, 55740, TECÁMAC DE FELIPE VILLANUEVA,
MÉX.**

ASESOR DE TESIS:

SUPERVISOR TÉCNICO:

**M. EN C. CINDY FABIOLA HERNANDEZ
PÉREZ**

**M. EN C. SANDRA IVETTE PÉREZ
AGÜEROS**

SUSTENTANTE:

LUIS ANGEL MENDOZA TORRES

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
1.0 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Generalidades. Biología del género <i>Salmonella</i>	1
1.2 Nutrición e identificación bioquímica del género <i>Salmonella</i>	4
1.3 Características de crecimiento del género <i>Salmonella</i>	5
1.4 Clasificación y taxonomía del género <i>Salmonella</i>	5
1.5 Salmonelosis.	6
1.6 Alimentos, vía de transmisión de trastornos digestivos derivados del género <i>Salmonella</i>	7
1.7 Antimicrobianos.	8
1.7.1 Clasificación de los antimicrobianos.	9
1.7.2 Resistencia a antimicrobianos (RAM).	10
1.7.3 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.	11
1.7.4 Ejemplos de genes de RAM.	13
1.7.5 Cepas multi-resistentes.	14
1.7.6 Relevancia de la RAM como problema de salud pública.	14
1.7.8 Métodos de detección de resistencia a antimicrobianos.	14
1.8 Secuenciación masiva.	16
1.9 Bioinformática.	18
1.9.1 Lenguajes de programación.	18
1.10 Filogeografía.	19
1.11 Antecedentes de <i>Salmonella</i> en México.	19
2.0 JUSTIFICACIÓN.	23
3.0 HIPÓTESIS.	25

4.0 OBJETIVOS.	26
4.1 Objetivo general.	26
4.2 Objetivos particulares.	26
5.0 METODOLOGÍA.	27
5.1 Diagrama de flujo.	27
5.2 Muestras.	27
5.3 Secuenciación de los aislados de <i>Salmonella</i>	28
5.4 Análisis bioinformático.	28
5.4.1 Archivos FASTQ.	28
5.4.2 Asignación de serotipo.	28
5.4.3 Base de datos de <i>Salmonella</i>	29
5.4.4 Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos.	29
5.4.5 Uso de lenguajes de programación para la automatización de análisis estadísticos.	30
5.4.6 Análisis filogenéticos entre los aislados de <i>Salmonella</i> de un cierto serotipo.	31
5.4.7 Análisis filogeográfico.	31
6.0 RESULTADOS.	32
6.1 Generalidades del Atlas de <i>Salmonella</i> en México.	32
6.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium.	40
6.2.1 ¿Quién es <i>Salmonella</i> Typhimurium?	40
6.2.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium en México.	42
6.2.3 <i>Salmonella</i> Typhimurium en el mundo.	43
6.2.4 Resultados obtenidos de <i>S. Typhimurium</i>	44
6.3 <i>Salmonella</i> Agona.	51
6.3.1 ¿Quién es <i>Salmonella</i> Agona?	51
6.3.2 <i>Salmonella</i> Agona en México.	53
6.3.3 <i>Salmonella</i> Agona en el mundo.	54
6.3.4 Resultados obtenidos de <i>S. Agona</i>	54

6.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis.	61
6.4.1 ¿Quién es <i>Salmonella</i> Enteritidis?	61
6.4.2 <i>Salmonella</i> Enteritidis en México.	64
6.4.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis en el mundo.	64
6.4.4 Resultados obtenidos de <i>S. Enteritidis</i>	65
7.0 DISCUSIÓN.	73
8.0 CONCLUSIONES.	78
9.0 PROSPECTIVAS.	79
10.0 APÉNDICES.	80
10.1 APÉNDICE A. Formato FASTQ.	80
10.2 APÉNDICE B. Archivo de salida del software CLC.	80
10.3 APÉNDICE C. Archivo de salida del software SRST2.	81
10.4 APÉNDICE D. Archivo de salida del software SeqSero.	82
10.5 APÉNDICE E. Archivo de salida del software ARIBA.	83
10.6 APÉNDICE F. Base de datos EnteroBase.	84
10.7 APÉNDICE G. Matrices de genes de resistencia para cada aislado identificado en la SSB.	85
10.8 APÉNDICE H. <i>Script</i> de Python.	86
10.9 APÉNDICE I. <i>Script</i> de R.....	86
10.10 APÉNDICE J. Procesos bioinformáticos en terminal.	87
11.0 REFERENCIAS.	88

ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ASCII: American Standard Code for Information Interchange (Código Estándar Americano para el Intercambio de Información).

ARIBA: Antimicrobial Resistance Identification By Assembly (Identificación de Resistencia Antimicrobiana por Ensamble).

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATR: Acids Tolerance Response (Respuesta de Tolerancia a los Ácidos).

Aw: Activity of wáter (Actividad de agua).

C: Citosina.

CFSPH: Center for Food Security and Public Health (Centro de Seguridad Alimentaria y Salud Pública).

CNRDOGM: Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados.

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

CRT: Cyclic Reversible Termination (Terminación Cíclica Reversible).

EUA: Estados Unidos de América

G: Guanina.

GLASS: Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos).

hq-SNP: high quality - Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleótido único de alta calidad).

InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

LIA: Medio de cultivo Agar-lisina-hierro.

LPS: Lipopolisacárido.

LyveSet: *Listeria*, *Yersinia*, *Vibrio* and *Enterobacteriaceae* reference lab SET – SNP Extraction Tool (Conjunto de laboratorio para referencia de *Listeria*, *Yersinia*, *Vibrio* y *Enterobacteriaceae* – Herramienta para la extracción de SNP).

MLST: Multilocus Sequence Typing (Tipificación Multilocus de Secuencias).

NGS: Next Generation Sequencing (Secuenciación de Siguiete Generación).

NTS: Nontyphoidal Salmonella disease (Salmonelosis no tifoidea).

OGM: Organismos Genéticamente Modificados.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBPs: Penicillin Binding Proteins (proteínas de unión a penicilina).

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

RAM: Resistencia a antimicrobianos.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

SeqSero: *Salmonella* serotyping from genome sequencing data (Serotipificación de *Salmonella* a partir de los datos de secuenciación del genoma).

SIM: Medio de sulfuro indol para movilidad.

SPI: *Salmonella* Pathogenicity Island (Isla de patogenicidad de *Salmonella*).

SRST2: Short Read Sequence Typing for Bacterial Pathogens (Tipificación por lectura de secuencia corta para bacterias patógenas).

SSB: Subdirección de Secuenciación y Bioinformática.

ST: Sequence Type (Tipo de Secuencia).

SVP: *Salmonella* Virulence Plasmid (plásmido de virulencia de *Salmonella*).

T: Timina.

TSI: Medio de cultivo Agar-hierro-triple azúcar.

UE: Unión Europea

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

V: Versión.

WGS: Whole Genome Sequencing (Secuenciación de genoma completo).

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el análisis bioinformático de 1557 secuencias de genoma completo de *Salmonella*, con la finalidad de elaborar el “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015 – 2017, secuenciación de genoma completo y genes de resistencia a antimicrobianos (RAM)”.

Las muestras de alimentos de origen animal de las que se aisló *Salmonella* en el período comprendido del 2015 – 2017, fueron colectadas por la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública de toda la República mexicana a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). La Subdirección de Secuenciación y Bioinformática (SSB) del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) llevó a cabo la secuenciación de todos estos aislados mediante las plataformas de Illumina®: MiSeq y NextSeq. Las secuencias de cada aislado de *Salmonella*, están resguardadas en la base de datos de *Salmonella* de la SSB, siendo estas el objeto de estudio del presente trabajo.

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas se emplearon las herramientas bioinformáticas SRST2, SeqSero, ARIBA, CLC y LyveSet; para facilitar la manipulación de los datos y la interpretación estadística se utilizaron los lenguajes de programación Python y R.

Los análisis bioinformáticos conllevaron a la tipificación de 1494 muestras analizadas de *Salmonella*, a la identificación de genes de RAM y al establecimiento de relaciones filogeográficas.

Mediante la tipificación de las muestras de *Salmonella*, se encontraron 75 serotipos diferentes. Los que resultaron mayormente aislados fueron *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Agona*, *S. Infantis* y *S. Enteritidis*.

En cuanto a la identificación de genes de resistencia, únicamente un aislado no presentó genes de RAM, mientras que el 49.9% exhibieron un sólo gen de RAM, el 8.2% dos genes

y alrededor del 42.2% expusieron más de tres genes (moda = 1, mediana = 2 y media aritmética = 4.179 genes). Los genes de RAM mayormente identificados confieren potencial resistencia a los grupos aminoglucósidos y tetraciclinas. El 39.8% de los aislados de *Salmonella* analizados posiblemente sean cepas multi-resistentes (presentan genes de RAM para 3 o más categorías de antimicrobianos distintos).

Finalmente, se encontró una relación estrecha entre la distribución geográfica de las cepas de *Salmonella* y los serotipos aislados, determinando que la filogenia mostrada entre las cepas analizadas mantiene una relación con la posición geográfica de las cepas del serotipo en cuestión de acuerdo con la estructura génica de las mismas cepas.

Aunque el presente estudio sólo ejemplifica 3 serotipos (*S. Typhimurium*, *S. Agona* y *S. Enteritidis*), la información que contendrá el Atlas una vez concluido permitirá a sus usuarios acceder a información referente a los serotipos identificados de *Salmonella* aislados de alimentos de origen animal en México, a la relación filogeográfica mostrada entre la cepas de un determinado serotipo y a los genes de RAM identificados de la mayor base de datos de secuencias de genoma completo de *Salmonella* que haya existido hasta el momento para nuestro país.

Es necesario mencionar que por cuestiones de confidencialidad por parte del SENASICA y COFEPRIS, no es posible revelar la fuente alimentaria de donde fue extraído cada aislado de *Salmonella* que fue analizado en el presente estudio.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades. Biología del género *Salmonella*.

El primer aislamiento e identificación de *Salmonella* fue realizado en 1885 en Estados Unidos por el bacteriólogo Theobald Smith y el veterinario Daniel E. Salmon, a quien se honraría posteriormente con el nombre del género bacteriano. Dicho aislamiento se realizó en carne de puerco y en primera instancia se le denominó como *Bacterium choleraesuis*, sin embargo, se le identificó posteriormente como *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (UNAM, 2014).

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, lo conforman bacilos Gram negativo los cuales se caracterizan por poseer una membrana externa, una pared celular diez veces más delgada que los Gram positivo y una membrana interna.

La membrana externa es una bicapa lipídica asimétrica que presenta estructuras de lipopolisacáridos (LPS) formados por tres regiones: polisacárido O (antígeno somático) en la parte externa, una estructura polisacárida central (Core) y lípido A en la parte interna, este último es el responsable de la actividad endotóxica del LPS cuando se divide o muere la célula; la pared celular está sumergida en el periplasma, está compuesta por peptidoglicano (polímero formado de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces β -1,4); la membrana interna es una bicapa lipídica que delimita al periplasma (Figura 1).

Los integrantes de este género no forman esporas, no son capsulados (salvo *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* y *S. Dublin*) y son móviles debido a los flagelos peritricos que expresan (antígeno flagelar H) con excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (Rogé, 2012).

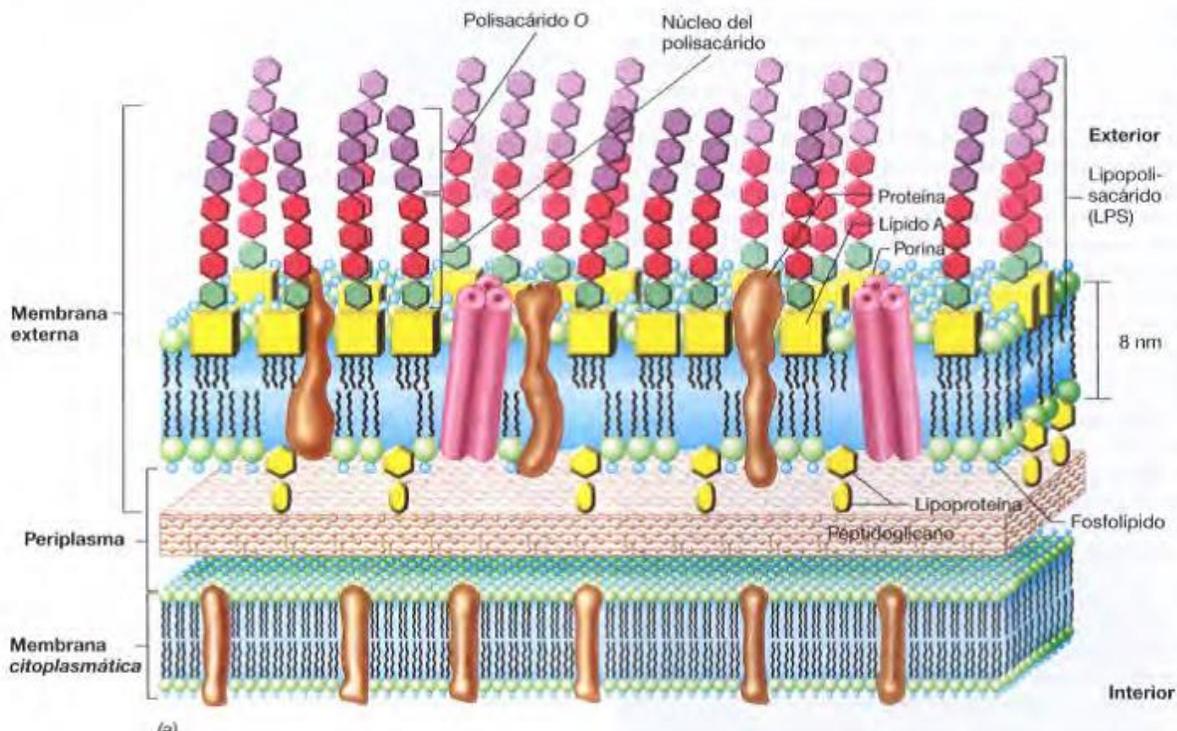


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de bacterias Gram negativas (Tomado de Brock, 2000).

El antígeno somático O (del alemán *ohne hauch*, "sin movimiento") es el polisacárido presente en la zona exterior del LPS que se encuentra anclado en la membrana externa del microorganismo, el cual actúa como una barrera de protección a agentes externos; está formado por unidades repetitivas llamadas subunidades "O", compuestas de cuatro a seis azúcares. La diversidad de este antígeno resulta de las variaciones en los componentes glucídicos de la subunidad "O" y de la variación en el tipo de enlace covalente entre los azúcares de la subunidad (Verma *et al*, 1988).

Las enzimas involucradas en la biosíntesis y ensamblaje del antígeno O están codificadas en el gen *rfb*. Se asocia una amplia diversidad genética dentro de los clusters de genes *rfb*, dando como resultado variaciones de dicho antígeno. Se han observado tres tipos diferentes de genes dentro de los grupos de genes *rfb*: (i) genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de los azúcares que forman la subunidad O; (ii) genes que codifican transferasas, que ensamblan sustituyentes de azúcar en la subunidad O; y (iii)

genes que codifican proteínas implicadas en los pasos de procesamiento y ensamblaje para construir el antígeno O a partir de la subunidad O (Fitzgerald *et al*, 2003).

El antígeno flagelar H (del alemán *hauch*, "por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento") es el filamento flagelar que permite el movimiento de la bacteria, está conformado por alrededor de 20,000 subunidades de la proteína denominada flagelina (proteína más abundante del flagelo), la variación de la composición de ésta es la causante de la diversidad antigénica que se pone de manifiesto en la serotipificación (Rogé, 2012).

La mayoría de las serovariedades expresa dos formas flagelares distintas denominadas fase 1 (proteína flagelar FliC (H1) codificada por el gen *fliC*) y fase 2 (proteína flagelar FljB (H2) codificada por el gen *fljB*) (Silverman *et al*, 1979). Se sabe que existe una coordinación para que se exprese solamente un antígeno a la vez por cada célula bacteriana (Bonifield *et al*, 2003). Las proteínas flagelinas FliC y FljB son idénticas en los primeros 71 aminoácidos y los últimos 46 aminoácidos, pero los aminoácidos que están expuestos en el medio son distintos, resultando en diferentes antigenicidades (Rogé, 2012).

El antígeno Vi (Capsular, de "virulencia") está conformado por un polisacárido y ayuda a formar una cápsula en la parte externa de la bacteria. Los genes *vipA*, *vipB* y *vipC* están implicados en la biosíntesis tras codificar enzimas que ensamblan a esta macromolécula. Ésta solamente la poseen algunas serovariedades como lo son *S. Dublin*, *S. Typhi* y *S. Paratyphi C* (CFSPH, 2005).

En conjunto, estos tres antígenos presentes en la mayoría de las bacterias del género *Salmonella*, han sido utilizados como herramientas para su serotipificación, clasificando a estas bacterias en alrededor de 1500 serotipos diferentes. Cabe destacar que esta clasificación, se estableció a partir de las pruebas de aglutinación con anti-sueros, sin embargo, a la fecha se conocen más de 2500 serotipos diferentes debido a la actualización a metodologías con mayor poder de resolución (Gonzalez *et al*, 2014).

1.2 Nutrición e identificación bioquímica del género *Salmonella*.

Este patógeno es anaerobio facultativo y se clasifica como quimioorganótrofo (oxida compuestos orgánicos para la obtención de energía) y como heterótrofo (utiliza compuestos orgánicos para satisfacer sus requerimientos nutricionales de carbono) (Rojas, 2016).

En la Tabla 1 se muestran los resultados de las reacciones bioquímicas que caracterizan al metabolismo de una cepa típica de *Salmonella* y que se utilizan para su identificación.

Tabla 1. Resultados de reacciones bioquímicas de una cepa típica de *Salmonella*.

Prueba	Reacción para <i>Salmonella</i>
Glucosa (TSI)	+
Lisina descarboxilasa (LIA)	+
H ₂ S (TSI, LIA y SIM)	+
Ureasa	-
Fermentación dulcitol	+ ^b
Fermentación manitol	+
KCN	-
Malonato	- ^c
Indol (SIM)	-
Fermentación lactosa	- ^c
Fermentación sacarosa	-
Voges-Proskauer	-
Rojo de Metilo	+
Citrato de Simmons	V ^{a+}
Oxidasa	-
Catalasa	+
Lactosa	-
Producción de gas	+
Movilidad (SIM)	+ ^d

a+: 90% o más positivos en 1 ó 2 días.

b: La mayoría de los cultivos de *S. Arizonae* son negativos.

c: La mayoría de los cultivos de *S. Arizonae* son positivos.

d: Excepto *S. enterica* serovar Pullorum, *S. enterica* serovar Gallinarum y cepas con flagelos disfuncionales.

V: Variable

(UNAM, 2014).

1.3 Características de crecimiento del género *Salmonella*.

Las bacterias pertenecientes a este género, se clasifican como mesófilas ya que su temperatura óptima de proliferación es de 35 a 37 °C aunque puede crecer en un rango de temperatura entre los 5 a 47 °C. También se clasifican como halófilas ligeras, debido a que a concentraciones superiores de 3 a 4% de NaCl se inhibe su crecimiento. La óptima A_w (índice de agua disponible que puede ser utilizada por un microorganismo, se define como la relación entre la presión de vapor del agua con los sustratos del cultivo y la presión de vapor de agua pura) del género *Salmonella* es 0.99, sin embargo, puede tolerar hasta un 0.93. Por lo que se refiere a pH, su rango óptimo de crecimiento se ubica entre 6.5 a 7.5 no obstante algunas cepas pueden soportar rangos de pH que van de 4.5 a 9.0, además de que también existen cepas resistentes que pueden tolerar valores muy bajos de pH como de 3.5 - 4 (pH del jugo gástrico), esto debido la expresión de un gen que activa el sistema ATR (un complejo sistema de defensa de ciertas bacterias que puede minimizar los efectos letales de un pH extremadamente bajo) de *Salmonella* (Jay *et al*, 2005).

1.4 Clasificación y taxonomía del género *Salmonella*.

El género *Salmonella* comprende únicamente 2 especies: *S. enterica* y *S. bongori* (anteriormente considerada como la subespecie V de *S. enterica*), subdivididas en subespecies y serovariedades. *Salmonella enterica* está formada por seis subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes reacciones bioquímicas, estas son:

- I. *S. enterica enterica*.
- II. *S. enterica salamae*.
- IIIa. *S. enterica arizonae*.
- IIIb. *S. enterica diarizonae*.
- IV. *S. enterica houtenae*.
- VI. *S. enterica indica*.

(UNAM, 2015).

Esta subdivisión ha sido apoyada por varios métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos. Cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovares, que están determinados por la diversidad de los antígenos O, H o Vi, acorde con la clasificación de Kauffmann–White (Gonzalez *et al*, 2014).

Se estima que existen más de 2500 serotipos distintos de *Salmonella* distribuidos en el mundo. En México, los serotipos que son aislados con mayor frecuencia en humanos son *Salmonella enterica*, subespecie *enterica* serotipo Enteritidis y *S. enterica*, subesp. *enterica* serotipo Typhimurium (Gutiérrez *et. al*, 2000; OMS, 2017).

Dependiendo de varios factores como son: la serovariedad, tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado, estado inmunológico del paciente e intervención médica, este patógeno puede ocasionar desde una infección gastrointestinal media a severa hasta una infección sistémica que comprometa la vida del paciente (Figuroa, 2005). De manera general, la enfermedad causada por esta bacteria, puede ser clasificada como fiebre tifoidea o fiebre no tifoidea (Salmonelosis).

1.5 Salmonelosis (no tifoidea) y fiebre tifoidea.

La salmonelosis no tifoidea (NTS por sus siglas en inglés) es una enfermedad transmitida por los alimentos que afecta a humanos y animales, el agente etiológico es *Salmonella enterica enterica* donde los principales causantes son los serovares *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* y *S. Heidelberg*. Esta, causa infecciones intestinales agudas en personas de todas las edades, sus principales síntomas son: diarrea acuosa, náusea, vómito, dolor abdominal y muscular y en ocasiones se presenta fiebre y dolor de cabeza (Andino, 2015). En pacientes inmunosuprimidos, lactantes y ancianos puede ocasionar infecciones invasivas graves como bacteremia y meningitis (Zaidi *et. al*, 2006).

Por otro lado, la fiebre tifoidea o fiebre enterica, es una enfermedad específica para humanos causada por *S. enterica* serovar Typhi (fiebre tifoidea) y *S. enterica* serovar Paratyphi (fiebre paratifoidea). La vía de transmisión es oral-fecal donde los alimentos juegan el papel de vehículos de transmisión. Sus principales síntomas son: fiebre, lengua revestida o cubierta, disminución de la frecuencia de la contracción cardíaca (bradicardia), salpullido y dolor muscular (Andino, 2015). Esta enfermedad, se considera

más riesgosa que la no tifoidea, debido a las implicaciones y complicaciones que puede tener.

Las complicaciones no se observan en el momento actual, sobre todo en el paciente correctamente diagnosticado y tratado. Las más graves y frecuentes suelen aparecer a partir de los 10 días de evolución, estas son la hemorragia y la perforación intestinal. Algunas complicaciones menos frecuentes se presentan en forma de neumonía, meningitis, espondilitis, endocarditis y abscesos en diversas localizaciones. Se puede considerar como complicación el estado de portador crónico, definido como la presencia de *Salmonella* Typhi en las heces o en la orina durante más de un año (Jurado *et al*, 2010).

1.6 Alimentos, vía de transmisión de trastornos digestivos derivados del género *Salmonella*.

Los alimentos son vehículos clave para la propagación de este patógeno en el ambiente, esto debido a lo siguiente:

- ❖ *Salmonella* está muy presente en animales domésticos y salvajes. Es prevalente en animales comestibles como lo son las aves de corral, los porcinos y vacunos, y también en mascotas, como gatos, perros, pájaros y reptiles como las tortugas.
- ❖ *Salmonella* puede atravesar toda la cadena alimentaria, desde los piensos para animales (mezcla de componentes de alimentos para consumo animal) y la producción primaria hasta los hogares, establecimientos e instituciones de servicios culinarios.
- ❖ Por lo general, las personas contraen salmonelosis a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal (principalmente huevos, carne, aves de corral y leche), aunque también hay otros alimentos que se han vinculado a la transmisión, como por ejemplo las hortalizas contaminadas por estiércol o por riego con aguas residuales.
- ❖ También pueden transmitirse entre las personas por vía fecal-oral (como el caso de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*).

- ❖ Además, se pueden producir casos cuando las personas entran en contacto con animales infectados, incluidas las mascotas, aunque a menudo, esos animales no presenten signos de enfermedad (OMS, 2017).

Se estima que este patógeno es responsable de aproximadamente 30% de las muertes relacionadas con infecciones transmitidas por alimentos, por lo cual se considera un problema de salud pública mundial (OMS, 2017).

Para combatir los trastornos digestivos generados por especies pertenecientes al género *Salmonella*, se han aislado y sintetizado compuestos químicos que atacan a estos agentes biológicos (antimicrobianos) de tal forma que preservan el bienestar o incluso la vida humana y/o animal.

1.7 Antimicrobianos.

Los antimicrobianos son sustancias químicas que pueden ser aisladas de cultivos microbianos que por lo general son productos metabólicos de bacterias u hongos (clasificados como antimicrobianos de origen natural o biológico), o bien, sintetizadas químicamente en un laboratorio (de origen sintético). Estas deben de cumplir con al menos tres condiciones: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped. A la sustancia química extraída a partir un agente biológico y que se le realizan algunas modificaciones en su estructura química con el objetivo de mejorar sus propiedades como, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables, se le denomina antimicrobiano de origen semisintético. A los antimicrobianos que tienen como blanco a bacterias se les denominan antibióticos (Errecalde, 2004; Paredes & Roca, 2004).

1.7.1 Clasificación de los antimicrobianos.

Los antimicrobianos se clasifican en grupos o familias de acuerdo a su estructura química. En la Tabla 2 se muestran los grupos de antimicrobianos potencialmente inhibidos por los aislados de *Salmonella* analizados en el presente estudio. Cada categoría presenta un mecanismo de acción específico por el que combaten a sus bacterias blanco (Molina, 2015).

Tabla 2. Grupos y ejemplos de antimicrobianos de uso terapéutico.

Grupo	Mecanismo de acción	Ejemplos de antimicrobianos
Aminoglucósidos	Inhibición de la síntesis proteica.	Estreptomina ^{1, 3} , Gentamicina ¹ , Kanamicina ¹ , Amikacina ¹ , Netilmicina ⁴ .
Betalactámicos	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.	Penicilina ² , Ampicilina ^{1, 3} , Amoxicilina-ácido clavulánico ¹ , cefalotina ¹ , Cefazolina ² , Ceftriaxona ³ , Cefotaxima ⁴ , Carbenicilina ⁴ .
Fenicoles	Inhibición de la síntesis proteica.	Cloranfenicol ^{1, 3} .
Macrólidos	Inhibición de la síntesis proteica.	Eritromicina ² .
Quinolonas (Q) / Fluoroquinolonas (FQ)	Inhibición de la ADN girasa.	Ácido nalidíxico ^{1, 3} (Q), Ciprofloxacino ² (FQ), Pefloxacina ⁴ .
Sulfonamidas	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos.	Trimetoprim-sulfametazol ¹ , Sulfonamida ¹ , Sulfisoxazol ³ .
Trimetoprima	Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos.	Trimetoprim-sulfametazol ¹ .

Grupo	Mecanismo de acción	Ejemplos de antimicrobianos
Tetraciclinas	Inhibición de la síntesis proteica.	Tetraciclinas ^{1, 3} .
Fosfomicina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.	Fosfomicina.

¹ Busani *et al*, 2004.

² Thung *et al*, 2018.

³ Andino & Hanning, 2015.

⁴ Seija & Vignoli, 2008.

Para salmonelosis no tifoideas no se recomienda el uso de antimicrobianos ya que es una infección autolimitada (enfermedad que tiende a terminar sin necesidad de un tratamiento) con excepción de tratarse a personas vulnerables como infantes, personas de la tercera edad o personas inmunocomprometidas, sin embargo, con respecto a fiebre tifoidea, es necesario el tratamiento con antimicrobianos debido al alto grado de virulencia que poseen las serovariedades que las provocan (Jurado, 2010).

Se han presentado casos donde el tratamiento de infecciones ocasionadas por *Salmonella* ha presentado complicaciones, esto debido a que se han aislado cepas que presentan resistencia a antimicrobianos. La resistencia se asocia a la expresión de genes dentro del genoma bacteriano o a la adquisición de elementos móviles como plásmidos y cassettes que contienen y confieren esa característica a las bacterias (WHO, 2005).

1.7.2 Resistencia a antimicrobianos.

Para el caso de las bacterias, la resistencia puede adquirirse mediante dos procesos; el primero es el resultado de mutaciones (modificaciones genéticas) en el cromosoma bacteriano que se dan de forma natural tras el paso de generaciones (transferencia vertical de genes); el segundo proceso está mediado por la captación de material genético exógeno que comúnmente utiliza como vehículo de transferencia a los plásmidos

(transferencia horizontal de genes). Estos procesos se ven acelerados por el mal uso y el abuso de los antimicrobianos (Calvo *et. al*, 2009; WHO, 2005).

Los genes de RAM están relacionados con varios mecanismos de defensa de las bacterias como lo son: codificar una proteína (enzima) que inhiba la acción del antimicrobiano, cambiar la conformación o configuración del sitio blanco del fármaco, codificar una bomba proteica que expulse al antibiótico fuera de la bacteria y así inhibir su acción o cambiar la permeabilidad de la membrana para impedir la entrada del fármaco. Dada la importancia de los genes de RAM como un problema de salud pública, es necesario conocer a detalle estos mecanismos que conllevan a la resistencia a determinados grupos antimicrobianos.

1.7.3 Mecanismos de resistencia a antimicrobianos.

Los principales mecanismos de resistencia a antimicrobianos son los siguientes:

- Inactivación mediada por enzimas: es el mecanismo que mayormente se encuentra involucrado en la inhibición de antimicrobianos; este es ocasionado por las betalactamasas (enzimas) las cuales hidrolizan a los betalactámicos. Estas enzimas son ejemplo de productos de la expresión de genes que pueden estar presentes tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos. Otra forma de inactivación que no necesariamente es la hidrólisis de una molécula, es que pueden realizarse modificaciones en la estructura química de las moléculas como son las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones, que inactivan principalmente a aminoglucósidos (Vignoli *et al*, 2008).
- Alteración en la permeabilidad celular a antibióticos: se presenta fundamentalmente en las bacterias Gram negativo, donde la membrana externa de la envoltura celular es rica en lípidos por lo que es impermeable a sustancias hidrofílicas. Dichas sustancias quedan confinadas a la penetración a través de proteínas transmembranales con función de porinas. La disminución de la expresión de dichas porinas puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al

espacio periplásmico. Se considera que en este caso los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico. La ocurrencia simultánea de este mecanismo unido a otro, por ejemplo hidrólisis enzimática (aún en niveles discretos), sí puede conferir altos niveles de resistencia y ocasionar fallos terapéuticos. Los antibióticos con moléculas de gran tamaño, como penicilina y vancomicina, son incapaces de pasar a través de las porinas de bacilos Gram negativo (Vignoli *et al*, 2008).

- Activación de bombas de eflujo antimicrobianas: la resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y fenicoles. En Gram negativo estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Este sistema permite la exportación de moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa (Vignoli *et al*, 2008).
- Alteración del sitio blanco: el sitio blanco de los betalactámicos son las diferentes PBPs. La información genética de estas proteínas se encuentra codificada en el genoma bacteriano y no en plásmidos. Las alteraciones del sitio blanco se producen por mutación espontánea a nivel cromosómico, sin embargo, elementos que regulan la expresión de esos genes sí puede ser codificada en un plásmido. La expresión de un gen alternativo, que codifique una PBP básicamente distinta a la existente, provoca que el antibiótico presente una baja afinidad o incluso no reconozca al sitio blanco de unión (Vignoli *et al*, 2008).

1.7.4 Ejemplos de genes de RAM.

Como se mencionó anteriormente, los genes de RAM son específicos para inhibir a un determinado grupo antimicrobiano. Algunos ejemplos de estos genes de RAM se muestran en la Tabla 3, indicando al grupo antimicrobiano que inhiben.

Tabla 3. Algunos ejemplos de genes de RAM identificados en los diferentes serotipos de *Salmonella* analizados en el presente estudio.

Familia antimicrobiana para la que confieren resistencia	Ejemplos de genes de RAM
Aminoglucósidos	<i>aac6-ly, aac6-laa, aadA, aph3la, strA, strB.</i>
Betalactámicos	<i>TEM, SHV, CMY, carb.</i>
Fenicoles	<i>catA2, floR.</i>
Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas.	<i>InuF, mphA.</i>
Trimetoprima	<i>dfr, dfrA.</i>
Fosfomicina	<i>fosA.</i>
Fluoroquinolonas	<i>qnrB, qnrS, oqxA, oqxBgb.</i>
Sulfonamidas	<i>sull, sulll.</i>
Tetraciclinas	<i>tetA, tetR, tetD.</i>

(Kumar *et al.*, 2014).

Las principales características que convierten a estos genes diferentes entre sí son: el agente etiológico de cual proviene el gen, la ubicación del gen (ya sea en el cromosoma bacteriano o en plásmidos), la funcionalidad que tendrá la proteína sintetizada y el sitio blanco de la proteína sintetizada.

Los genes de RAM, además de que pueden estar en un plásmido, es posible que formen parte de un genoma accesorio (genoma altamente variable y que es específico para cada cepa), lo cual dificulta el conocimiento de la ubicación precisa del gen, únicamente se lograría ensamblando el genoma completo y realizar un mapeo.

1.7.5 Cepas multi-resistentes.

Existen cepas de *Salmonella* que presentan distintos genes de RAM que confieren resistencia a diferentes familias antimicrobianas, a estas se les denominan cepas multi-resistentes.

Se entiende por multi-resistencia, a la capacidad de algunas cepas de un cierto microorganismo (en este caso *Salmonella*) de inhibir el efecto de diferentes grupos de antimicrobianos. Algunos estudios mencionan que para referirse a microorganismos multi-resistentes en el caso de bacterias Gram negativo, es necesario se presente resistencia a tres o más familias de antimicrobianos, a los que habitualmente son sensibles, como lo son betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas), aminoglucósidos y quinolonas (López *et al*, 2011).

1.7.6 Relevancia de la RAM como problema de salud pública.

Las especies del género *Salmonella* son reconocidas por la OMS como patógenos que requieren monitoreo mediante el GLASS. Por “resistencia a los antimicrobianos” se entiende la adquisición por parte de un microorganismo de resistencia a un medicamento antimicrobiano al que anteriormente era sensible. La adquisición de resistencias por parte de numerosos agentes infecciosos supone una creciente amenaza para la salud pública, que preocupa sobremanera en todos los países y en muchos sectores económicos. Resulta especialmente alarmante la rápida propagación a nivel mundial de bacterias multi-resistentes, las cuales, son causa de infecciones comunes y resisten al tratamiento con los fármacos antimicrobianos existentes (OMS, 2017).

De acuerdo con lo anterior, ha surgido la necesidad de métodos que permitan la detección de resistencia a antimicrobianos mostrada por ciertas bacterias, en este caso, las pertenecientes al género *Salmonella*, de tal forma que permitan un tratamiento efectivo.

1.7.8 Métodos de detección de la resistencia a antimicrobianos.

Los métodos tradicionales para la detección de susceptibilidad a antimicrobianos (antibiogramas) se basan principalmente en estudios fenotípicos, tras observar el crecimiento microbiano en presencia de diferentes antimicrobianos. Algunas de estas

técnicas son: dilución en agar (prueba estándar), macrodilución y microdilución en caldo y tiras con un gradiente de antibiótico, estas requieren un rango de 17-24 h para la obtención de resultados (March, 2017).

Con el fin de acortar el tiempo de obtención de resultados de antibiogramas tradicionales, se desarrollaron técnicas instrumentales rápidas y fiables (siempre comparando su fiabilidad con la prueba estándar). Ejemplos de estas técnicas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de algunas técnicas instrumentales para la obtención de antibiogramas.

Nombre de la técnica	Descripción	Tiempo estimado
Técnicas moleculares (principalmente PCR)	Permite la detección de material genético (ADN y ARN), la identificación del agente infeccioso y la caracterización de genotipos de resistencia y virulencia.	12 h para una PCR convencional.
Microarreglos	La detección está basada en un análisis de imágenes de la hibridación de una molécula diana a una sonda específica inmovilizada en un soporte sólido.	8 h.
Técnicas inmunocromatográficas	Permite la detección de enzimas bacterianas que hidrolizan antibióticos.	20 min.
Métodos colorimétricos	Principalmente utilizados para la detección de carbapenemasas (enzima que hidroliza un grupo de betalactámicos).	2 h.
Métodos de imagen	Ejemplo de este tipo de técnicas es la hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) en equipo ACCELERATE pheno™ SYSTEM.	5 h.
Nefelometría	Monitorea el crecimiento microbiano en tubos con medio líquido enriquecido y antibiótico, la radiación dispersada cuando un haz de luz atraviesa la suspensión de partículas (células microbianas) es proporcional a la cuantificación de microorganismos.	5 h.
Espectrometría de masas MALDI-TOF	Se basa en un análisis de proteínas, predice si las bacterias pueden producir enzimas que hidrolicen antibióticos.	3 h.

Nombre de la técnica	Descripción	Tiempo estimado
Quimioluminiscencia	La detección es mediante la comparación de cepas incubadas en antibióticos, la viabilidad de estas será proporcional a la señal quimioluminiscente por lo que una cepa resistente dará una señal semejante a una cepa sin antibiótico.	4 h. para Enterobacterias
Sensidiscos	Se colocan pequeños discos de papel impregnados con concentraciones conocidas del antimicrobiano en un cultivo solido ya sembrado con el microorganismo, se incuba, se mide el halo de inhibición de crecimiento y se compara el resultado con tablas.	-----

(March, 2017).

Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares sofisticadas que detectan la posible resistencia antimicrobiana a nivel de genes. La secuenciación masiva y los programas bioinformáticos son las herramientas que fungen como apoyo para optimizar la identificación taxonómica de *Salmonella*, así como de sus genes de resistencia, coadyuvando con ello a la posibilidad de escoger la mejor opción de tratamiento clínico y a reducir el impacto de la resistencia a los antimicrobianos que ya es un problema en México y en el contexto mundial.

1.8 Secuenciación masiva

La secuenciación es el conjunto de métodos y técnicas bioquímicas empleadas para determinar el orden de los nucleótidos (A, T, C, G) en una región específica de ADN o en el genoma de un organismo. El esquema general de la secuenciación masiva o secuenciación de siguiente generación (NGS por sus siglas en inglés) es que el ADN se fragmenta y mediante ligación se le añade secuencias ya conocidas de ADN a los extremos (adaptadores), a este conjunto de ADN fragmentado y adaptadores, se le llama Biblioteca genómica. Las bibliotecas genómicas, se amplifican clonalmente y se agrupan en *clusters* para ser secuenciados de forma masiva y en paralelo. La secuenciación se realiza entonces alternando ciclos de terminación reversible cíclica (CRT por sus siglas en inglés) y de toma de imágenes (*imaging*). La reacción CRT utiliza terminadores

reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente que a continuación son “fotografiados” en la toma de imágenes (a las “fotografías” se le denomina como datos crudos) y estos posteriormente son procesados para convertirlos en secuencias. Las secuencias cortas producidas por el instrumento a partir de los extremos del ADN con los adaptadores se denominan lecturas (*reads*).

Un aspecto importante en la NGS es el número de veces que cada base del genoma está presente en las lecturas de secuenciación producidas. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*depth of coverage*, o simplemente, *coverage*) y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma (Rodríguez *et. al*, 2012).

Los datos crudos obtenidos de la secuenciación se deben de analizar, resguardar, manejar e interpretar, es por ello que se recurre a la bioinformática ya que sus herramientas posibilitan la utilización eficiente de estos datos.

En los centros de investigación y/o de referencia del país principalmente se emplean la tecnología Illumina® que utiliza una química de secuenciación por síntesis basada en terminadores reversibles fluorescentes como MiSeq, NextSeq 500 y HiSeq 2500. Las plataformas disponibles son el MiSeq, NextSeq500 y HiSeq 2500 que son capaces de generar hasta 15Gb, 120Gb y 1Tb, correspondientemente (IBT, 2016; SENASICA, 2015; RAI, 2015).

Todavía hay algunos centros que ocupan la tecnología Ion Torrent, técnica de secuenciación por semiconducción (por medio de chips) que se basa en la detección de protones liberados durante el proceso de polimerización del ADN. Este tipo de secuenciación difiere de los demás tipos en que no usan nucleótidos modificados químicamente y que la detección no se realiza por métodos ópticos, sino por detección de pH (IBT, 2016; SENASICA, 2015). Un chip 316 es capaz de generar hasta 1 Gb (Rodríguez & Armengol, 2012).

1.9 Bioinformática

La bioinformática es un área de investigación interdisciplinaria en la interfaz entre la informática, las ciencias biológicas y la estadística. Involucra la tecnología que utiliza el cómputo para el almacenamiento, recuperación, manipulación y distribución de información relacionada con macromoléculas biológicas como ADN, ARN y proteínas. El objeto de estudio de la bioinformática comprende el análisis secuencial, estructural y funcional de genes y genomas y sus productos correspondientes, además del proceso de refinamiento de datos y el procesamiento de imágenes (Xiong, 2006).

La gran cantidad de datos extraídos a partir de la experimentación son tratados por software bioinformáticos de tal forma que se permite su interpretación en forma de tablas numéricas, imágenes y gráficos. Por otro lado, los datos en forma secuencial componen a gran variedad de bases de datos que sirven como referencia para programas bioinformáticos u otros estudios relacionados con la secuencia de nucleótidos que se esté estudiando.

Se entiende por software bioinformáticos (programas) a herramientas especializadas que combinan ingeniería de alto nivel computacional con una elevada sofisticación en materia de algoritmos para el tratamiento de grandes cantidades de datos (Grado *et al.*, 2003).

Dada la naturaleza “masiva” de los datos derivados de secuenciación y los programas bioinformáticos empleados para su análisis, es indispensable el uso de lenguajes de programación que permitan su manejo.

1.9.1 Lenguajes de programación

Los lenguajes de programación permiten la generación de archivos de órdenes (*scripts*) los cuales contienen una serie de instrucciones (comandos) computacionales para la ejecución de una tarea deseada. Algunos ejemplos de lenguajes de programación mayormente utilizados por la bioinformática son R y Python.

R es un lenguaje de programación orientado a objetos empleado para el cálculo estadístico y la generación de gráficos. Es un lenguaje muy utilizado debido a su capacidad de manipular y modificar valores numéricos y funciones; los gráficos que

elabora son de alta calidad ya que permiten la visualización de datos de forma dinámica con apoyo por diversas librerías como GoogleVis (Carmona, 2007) (Apéndice I, Figura 29).

Python es otro lenguaje de programación también orientado a objetos, ideal para *scripting* (lenguaje en archivos de órdenes) y desarrollo rápido de aplicaciones en diversas áreas y sobre la mayoría de las plataformas (Rossum, 2009) (Apéndice H, Figura 28).

Estos lenguajes facilitan la operación de herramientas bioinformáticas, que para este proyecto se emplearon para la asignación de serotipo, la identificación y análisis de genes de RAM. Adicionalmente también se emplean para realizar análisis filogeográficos entre las cepas de ciertos serotipos de *Salmonella*.

1.10 Filogeografía.

La filogeografía se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes asociados con su evolución. Parte de la idea de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía. Este análisis se aplica a niveles intraespecíficos o de especies cercanamente emparentadas (Domínguez *et. al*, 2009).

Para la elaboración del “Atlas de *Salmonella* en México” se realizaron análisis que permitirán conocer la relación filogenética entre los aislados de cada uno de los serotipos de *Salmonella*, incorporando la información de procedencia geográfica de la muestra, se lograra identificar si existen patrones que gobiernen su distribución en el territorio nacional.

1.11 Antecedentes de *Salmonella* en México.

Entre 1974 y 1981 el Laboratorio de Enterobacterias del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales de México llevó a cabo la identificación mediante pruebas bioquímicas y la tipificación serológica de 4522 cepas de *Salmonella* aisladas de muestras clínicas humanas, de alimentos, agua de drenaje y animales y origen humano procedentes de distintas ciudades del país (entre ellas, Ciudad de México, Guadalajara, Monterrey, Acapulco y Puebla). Reportaron la Identificación 80 serotipos de *Salmonella*,

de los que 35 no se habían reconocido anteriormente. Los serotipos más aislados en humanos fueron: *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Newport*, *S. Poona* y *S. Panama*. En cambio, los serotipos más aislados en alimentos fueron *S. Derby*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium*, *S. London* y *S. Agona*; mientras que en animales, se aislaron 31 serotipos (principalmente de aves) de los cuales predominaron *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. En agua de drenaje, se aislaron 69 serotipos, siendo los más frecuentes *S. Derby*, *S. Agona* y *S. Adelaide* (siendo la primera vez que se aísla este serotipo en México). *S. Agona* se aisló el 4.6% en humanos y 4.3% en alimentos, lo cual no se tenía registro en el país (González *et al.*, 1985).

Se discute que entre 1940 y 1962, se habían identificado 72 serotipos de *Salmonella* en México y tras considerar los serotipos identificados en este estudio, se registran hasta el momento 110 serotipos diferentes de *Salmonella* en México. De los 10 serotipos de *Salmonella* aislados con mayor frecuencia en humanos, 6 son los mismos encontrados más frecuentes en México entre 1940 y 1962 (*S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Newport*, *S. Poona*, *S. Panama* y *S. Infantis*), por lo que se puede inferir que el patrón general de *Salmonella* en México no ha sufrido variaciones importantes durante estos años (González *et al.*, 1985).

Además, se observó que en portadores sanos predominaba *S. Derby* mientras que en pacientes hospitalizados predominaba *S. Typhimurium*. También se encontró que las cepas provenientes de hospitales tienen mayor resistencia a antibióticos que las cepas de laboratorios privados. Un dato interesante que sobresale de este estudio es que se registra en 1972 el aumento en la frecuencia de aislamientos de *S. Agona* (González *et al.*, 1985).

Por otra parte, los laboratorios para serotipificación del InDRE reportaron un estudio realizado entre los años de 1972 – 1999, en el cual se analizaron 1372 muestras clínicas de *Salmonella* aisladas por el Laboratorio de Bacteriología Entérica del InDRE y 23019 muestras de alimentos y ambientales aisladas por los 30 laboratorios estatales de la Secretaría de Salud. El 64.9 % (15843/24394) de las muestras era de origen humano mientras que el 35.1% (8551/24394) fueron de origen no humano, de estas últimas el 57.6% eran de alimentos, el 4.5% de agua, y el 37.9% de muestras ambientales

(incluyendo aislamientos de animales). De las cepas aisladas de alimentos, el 51% eran de alimentos preparados, 23% de productos cárnicos, 22% de carne, 3% de lácteos y el 1% de huevo (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Se llevó a cabo la serotipificación utilizando sueros somáticos y flagelares, con esto se identificaron en total 199 serotipos de *Salmonella*. Los serotipos mayormente aislados en muestras humanas fueron *S. Typhimurium* con el 20.4% (3225/15843), *S. Enteritidis* con el 18.3% (2893/15843), *S. Typhi* con el 7.1% (1128/15843) y *S. Agona* con el 5.5% (866/15843). Mientras que en las muestras no humanas predominó *S. Derby* con el 13.7% (1176/8551), *S. Anatum* con el 8.7% (748/8551), *S. Agona* con el 7.5% (643/8551), *S. Typhimurium* con el 6.7% (578/8551) y *S. Enteritidis* con el 6.7% (570/8551) (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Se cita que *S. Enteritidis* en los últimos años ha tenido un repunte debido al consumo de alimentos contaminados con este serotipo. Se ha observado una estrecha relación de este serovar con aves de corral (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Miranda *et al.* (2009) entre enero del 2007 y agosto de 2008, analizaron 441 muestras de alimentos sin procesar, 116 muestras de carne de aves de corral, 81 muestras de carne de cerdo, 73 muestras de carne de bovino, 33 muestras de queso, 61 muestras de pescado y 78 muestras de vegetales recolectados en tiendas minoristas y supermercados en Hidalgo.

La identificación de *Salmonella* se realizó mediante pruebas bioquímicas, dando como resultado la detección de este patógeno en 93 alimentos de 441 analizados (21.1%). Se identificó en carne de ave (35.3%), en queso crudo (30.3%), vegetales crudos (21.8%), carne de puerco (17.3%) y carne de res (15.1%), en pescado no se detectó dicho patógeno. Se resalta que las muestras provenientes de locales minoristas registran una mayor prevalencia de *Salmonella* que en supermercados (Miranda *et al.*, 2009).

A los 93 aislados de *Salmonella* se les realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, donde registraron cepas con alta resistencia a cloranfenicol y algunas con resistencia a aminoglucósidos y quinolonas. Puntualizan que las bacterias resistentes a antimicrobianos aisladas de alimentos, son fuente potencial de la diseminación de estas

en humanos y que el incremento de la prevalencia de *Salmonella* resistente a antimicrobianos puede ser debido al uso de agentes antimicrobianos en alimento animal (Miranda *et al*, 2009).

Nayarit *et al.* (2016) analizaron 100 muestras de carne molida de res que se expende en la capital mexicana, 50 muestras provenientes de supermercados y 50 del mercado informal (como tianguis, carnicerías y mercados públicos). El aislamiento e identificación de *Salmonella* se realizó por pruebas bioquímicas y PCR convencional. Los aislados de *Salmonella* obtenidos se enviaron a tipificar al InDRE.

El resultado obtenido fue que el 6% (3/50) de las muestras de supermercados resultaron positivas para *Salmonella*, mientras que en el 32% (16/50) de las muestras del mercado informal estuvo presente. Los serotipos predominantes fueron *S. Lomita* y *S. Derby*. Un análisis de susceptibilidad antimicrobiana reveló que la mayor resistencia fue para betalactámicos. El 73.7% de los aislamientos son multi-resistentes. Además, se menciona que el porcentaje de positividad de *Salmonella* puede variar debido a la zona geográfica y la época del año en la que se realice el muestreo (Nayarit *et al.*, 2016).

Es necesario una mejor aplicación de la ley vigente para expendios de carne caliente (mercado informal). El mercado informal muestra que la positividad a *Salmonella* es 6 veces superior que en los supermercados. Por otra parte, la alta resistencia a antibióticos muestra ser un fuerte problema que se enfrentará el humano para el tratamiento de la salmonelosis. Por ello es necesario migrar a un sistema activo de vigilancia epidemiológica para poder combatir esta problemática, esto se puede apoyar de estudios de diversidad genética, presencia y mecanismos de transmisión de genes de resistencia y virulencia (Nayarit *et al.*, 2016).

2.0 JUSTIFICACIÓN

La Subdirección de Secuenciación y Bioinformática (SSB) del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) del SENASICA, realiza la secuenciación masiva de genomas de bacterias patógenas de interés alimentario, como es el caso del género *Salmonella*. Este es el agente etiológico de la salmonelosis, enfermedad transmitida por alimentos de gran impacto en todo el mundo, que posee una alta propagación en el ambiente, siendo humanos y animales sus principales huéspedes.

Actualmente la SSB tiene como proyecto la realización de un Atlas de *Salmonella* en México, con la información obtenida de muestras aisladas en alimentos de origen animal remitidas por la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública de toda la República Mexicana en el período comprendido del 2015 – 2017 a través de la COFEPRIS. En este Atlas, se expondrá la información referente a la diversidad encontrada de serotipos de *Salmonella*, la frecuencia de aislamientos de cada serovariedad, la identificación de genes de RAM dentro de las muestras analizadas (lo cual permitirá la construcción de un perfil de resistencia a antimicrobianos *in silico* para cada serotipo), la determinación de posibles cepas multirresistentes y una primera aproximación de la distribución geográfica de los serotipos en México.

En el presente trabajo se describe el proceso de elaboración del Atlas de *Salmonella* en México, esencialmente en lo referente a los análisis bioinformáticos. Se tomó a *S. Typhimurium*, *S. Agona* y *S. Enteritidis* como modelos para ejemplificar el proceso realizado, el cual será implementado para cada uno de los serotipos identificados en la SSB, de tal forma se recopilará la información fundamental que compondrá al “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015-2017, secuenciación de genoma completo y genes de resistencia a antimicrobianos”.

La información contenida en este Atlas será útil para la optimización de las estrategias de monitoreo y vigilancia epidemiológica de *Salmonella* spp. que actualmente operan, para el desarrollo de metodologías que preserven la inocuidad alimentaria, al tiempo que

puedan servir de apoyo para la elección de tratamientos clínicos más efectivos para el combate de este patógeno el cuál, es uno de los problemas de salud pública de mayor importancia tanto en México como en el contexto mundial.

En el presente proyecto se inserta en el contexto de las acciones a llevar a cabo por parte del SENASICA como parte de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos que a su vez responde a acuerdos internacionales en materia de RAM como el plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020 o el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos de la OMS (FAO, 2016; OMS, 2015).

3.0 HIPÓTESIS

Si se realiza el análisis de más de 1400 aislados de *Salmonella* secuenciados en la SSB provenientes de todos los estados de la República Mexicana, se obtendrá una primera aproximación a la diversidad serotípica, genómica y genética de la especie circulante en puntos de venta, misma que complementará la información que se tiene documentada en el país sobre este género.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Elaborar el “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015-2017, secuenciación de genoma completo y genes de Resistencia a Antimicrobianos”.

4.2 Objetivos específicos.

- Exponer el número de aislamientos de los distintos serotipos de *Salmonella* en México durante el período 2015 - 2017.
- Analizar los genes de RAM que presente cada uno de los aislados de *Salmonella* secuenciados.
- Construir un perfil de genes de RAM (*in silico*) para cada uno de los serotipos de *Salmonella* identificados.
- Analizar la distribución geográfica de los aislados de *Salmonella* de cada uno de los serotipos identificados.
- Construir y analizar las relaciones filogeográficas mostradas por los aislados de *Salmonella* de los serotipos identificados.
- Automatizar los análisis realizados mediante la implementación de *Scripts* (empleando lenguajes de programación).

5.0 METODOLOGÍA

5.1 Diagrama de flujo.

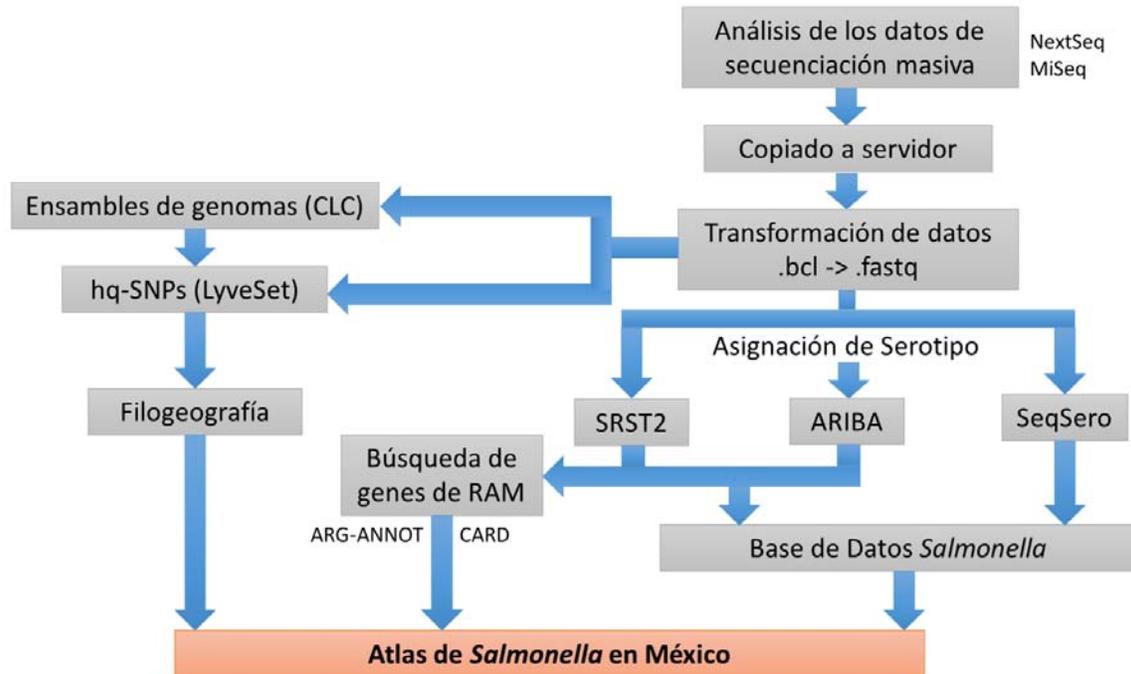


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología empleada.

5.2 Muestras.

En el presente estudio, se analizaron 1557 muestras de *Salmonella* provistas por los Laboratorios Estatales de Salud Pública de los diferentes estados de la República mexicana a través de la COFEPRIS, cabe mencionar que algunos estados remitieron un mayor número de muestras con respecto a otros estados. Dichas muestras, se aislaron de matrices alimentarias de origen animal en puntos de venta durante el período 2015-2017, fueron entregadas al Laboratorio de Diagnóstico para la Detección de Organismos Patógenos (LDDOP) del SENASICA donde se corroboró la pureza de los aislados y posteriormente fueron proporcionadas a la SSB como suspensiones bacterianas para su extracción de ADN, secuenciación y análisis bioinformático (SENASICA, 2015).

5.3 Secuenciación de los aislados de *Salmonella*.

La SSB emplea tecnología de secuenciación masiva de las plataformas Illumina®: *MiSeq* y *NextSeq*. Con ellas se lleva a cabo la secuenciación de genoma completo (WGS por sus siglas en inglés) de todas las cepas de *Salmonella* que previamente fueron re-aisladas por el LDDOP.

Los datos resultantes de la secuenciación (lecturas) fueron copiados al servidor a cargo del área de bioinformática de la SSB para realizar los análisis correspondientes.

5.4 Análisis bioinformático.

Una vez que los aislados de *Salmonella enterica* han sido secuenciados, en la SSB se realizan los análisis bioinformáticos necesarios para obtener la información referente a la identificación del serotipo del aislado y de los genes de resistencia a antimicrobianos que pueda presentar.

5.4.1 Archivos FASTQ.

Las lecturas son convertidas a archivos de texto plano con formato FASTQ mediante el software de Illumina® llamado *bcl2fastq*. Este es un formato informático basado en texto, utilizado para representar las secuencias de ácidos nucleicos en el que los nucleótidos se representan usando códigos de una sola letra (A, T, C, G). El formato FASTQ también contiene las medidas de calidad de cada nucleótido en escala PHRED. Esta escala refleja la probabilidad de que una base haya sido asignada erróneamente. Tanto la secuencia como la puntuación de la calidad están codificadas con un solo carácter ASCII para una mayor compresión de los datos y con ello permitir que ocupen el menor espacio posible en cuanto a peso de archivos (Apéndice A, Figura 21).

5.4.2 Asignación de serotipo.

La asignación de serotipo para cada aislado de *Salmonella* secuenciado se realiza a nivel de secuencia empleando los programas SRST2 V. 0.2.0, SeqSero V. 1.0 y ARIBA V. 2.11.1. **SRST2** (*Short Read Sequence Typing for Bacterial Pathogens*) es una herramienta basada en mapeos de lectura para la detección rápida y precisa de genes,

alelos y realizar MLST a partir de datos de secuenciación de genomas en formato FASTQ; este software también permite identificar a los genes de resistencia presentes en las secuencias tras hacer la comparación con los genes reportados en base de datos ARG-ANNOT (Kumar *et. al*, 2014) (Apéndice C, Figura 23). **SeqSero** (*Salmonella* serotyping from genome sequencing data) también utiliza los datos de secuenciación del genoma completo en formato FASTQ y los compara con la información presente en bases de datos curadas de determinantes de serotipos de *Salmonella* (analiza al grupo de genes *rfb*, *fliC* y *fliB*) (Apéndice D, Figura 24). **ARIBA** (Antimicrobial Resistance Identification By Assembly) utiliza un enfoque combinado de mapeo/alineamiento local y ensamble dirigido para identificar genes a partir de lecturas pareadas de secuencias, lo que permite la obtención de genes contiguos; el software toma como referencia a bases de datos ARG-ANNOT, CARD, MEGARes y ResFinder. Generalmente se utiliza para la tipificación de bacterias por secuencias multi-locus (MLST), para *Salmonella* identifica los genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA*, además identifica los genes de resistencia presentes en la muestra al igual que SRST2 (Hunt, 2017) (Apéndice E, Figura 25).

5.4.3 Base de datos de *Salmonella*.

Una vez identificados los serotipos de cada uno de los aislados de *Salmonella*, la SSB construyó una base de datos con la información de cada uno de estos (base de datos de *Salmonella*); esta información se compone principalmente por el ID de la muestra (código de identificación asignado por la SSB para cada aislado de *Salmonella*), el serotipo, la procedencia (estado de la República mexicana del cual proviene el aislado) y la fuente alimentaria de origen animal de la cual se extrajo cada uno de los aislados de *Salmonella* (Figura 3).

5.4.4 Identificación de genes de resistencia a antimicrobianos (RAM).

Se realizó la identificación de todos los genes de RAM para cada uno de los aislados secuenciados. Toda la información recabada se agrupó en una matriz denominada “Matriz de RAM” (contiene los IDs de los aislados y sus respectivos genes de RAM identificados) (Apéndice G, Figura 27). Todos los genes de RAM contenidos en esta matriz son clasificados en las categorías de antimicrobianos que inhiben utilizando las bases de datos ARG-ANNOT y CARD, información que se almacena en una matriz

independiente denomina “Matriz de RAM traducidos” (de igual forma contiene los IDs de los aislados con los antimicrobianos que inhiben) (Apéndice G, Figura 27). Esta última matriz se utilizó para hacer un análisis de frecuencia de genes de RAM de todos los aislados de *Salmonella* analizados.

Conociendo los genes de RAM “traducidos” a los grupos de antimicrobianos que inhiben para cada uno de los aislados de *Salmonella*, se realiza un conteo total de los genes de RAM de todas las muestras analizadas; los cuales se filtran y se clasifican a la clase antimicrobiana a la que pertenecen, esto se realiza con la ayuda de los lenguajes de programación Python y R.

5.4.5 Uso de lenguajes de programación para la automatización de análisis estadísticos.

Como parte del presente proyecto, una vez identificados los genes de RAM de todos los aislados de *Salmonella* secuenciados se emplearon los lenguajes de programación Python y R para lograr la automatización de tareas mediante una serie de comandos o *scripts*. Esto fue relevante por la continua actualización del análisis y la generación de gráficos que se realizaron conforme se incorporan más aislados secuenciados a la base de datos de la SSB.

Ejemplo de las tareas automatizadas que se ejecutaron con estos lenguajes fue la filtración, la clasificación, el conteo y el reacomodo de datos contenidos en la base de datos de *Salmonella* y en las matrices de RAM (Apéndice H, Figura 28).

Otros ejemplos de automatización y que resultaron de gran importancia en la elaboración de este proyecto debido a que permite la optimización de tiempo, es la generación representaciones gráficas como: la distribución del número de genes de resistencia en las muestras analizadas de *Salmonella* (se muestra el *script* de este grafico en la Apéndice I, Figura 29), el número de los aislamientos de los serotipos de *Salmonella*, distribución de la resistencia a ciertas familias antimicrobianas para cada serotipo (perfil de resistencia antimicrobiana *in silico*) y la distribución de los genes por categoría antimicrobiana.

5.4.6 Análisis filogenéticos entre los aislados de *Salmonella* de un cierto serotipo.

Se determinó la relación de parentesco entre las secuencias de cada aislado de un determinado serotipo identificado (filogenia) mediante el **software LyveSet V. 1.1.4g** que realiza una comparación pareada de hq-SNP entre las secuencias problema (en este caso las de los aislados de un mismo serotipo) en formato fastq y tomando como referencia un genoma de referencia del mismo serotipo. Este software permite un estricto control de los parámetros de calidad requeridos para que las posiciones sean reconocidas como variantes y es una aproximación muy fina para la comparación de aislados y la identificación certera de clonalidad en caso de que exista.

Para realizar lo anterior, fue necesario contar con una referencia ensamblada del serotipo en cuestión, para lo cual se empleó el **software CLC Genomics Workbench V. 9.0** (Apéndice B, Figura 22).

Como archivo de salida se obtuvo un análisis de hq-SNP, dentro de éste se genera una matriz con todas las diferencias de SNPs entre los aislados (comparación pareada) y un árbol filogenético de distancias asociadas al número de SNPs entre los diferentes aislados.

5.4.7 Análisis filogeográfico.

Un análisis de hq-SNPs entre las cepas de un determinado serotipo nos permite comparar su estructura génica, de tal manera que es posible discernir sobre la existencia de cepas clonales u otros grupos monofiléticos. Adicionalmente, conociendo la procedencia geográfica de las muestras (contenida en la base de datos de *Salmonella*) se puede realizar un análisis filogeográfico que permita establecer posibles patrones de colonización por parte de este serovar (se utiliza una gama de colores para cada línea del árbol filogenético).

Estos análisis filogeográficos constan, además de los análisis de hq-SNPs, la construcción de mapas de la República Mexicana donde se expone la distribución geográfica del serotipo en cuestión. Estos mapas también se construyeron empleando principalmente el lenguaje de programación R apoyado de librerías de GoogleVis.

6.0 RESULTADOS

6.1 Generalidades del Atlas de *Salmonella* en México.

Se secuenciaron un total de **1557 muestras** de *Salmonella* provenientes de todos los estados de la República Mexicana de matrices alimentarias de origen animal. Se identificaron 75 serotipos diferentes, con estos resultados, se construyó la base de datos de *Salmonella* de la SSB (Figura 3) la cual contiene el ID, el serotipo, la procedencia y la matriz alimentaria de donde se extrajo cada aislado.

	A	B	D	E	F	G	I	J	K	M
	Entregas	ID	Género y/o especie	Procedencia	Producto	Origen	Estatus	Resultado preliminar	Dictamen final	Modificaciones posteriores
7		Código de identificación asignado por la SSB para cada aislado de <i>Salmonella</i>		Estado de la república mexicana del cual proviene el aislado	Matriz alimentaria de origen animal de la cual proviene el aislado				Serotipo asignado del aislado de <i>Salmonella</i>	

Figura 3. Base de Datos de *Salmonella* de la SSB.

Es necesario mencionar que por motivos de confidencialidad por parte de las instituciones a las que les compete este proyecto (SENASICA y COFEPRIS), no es posible la divulgación del tipo de matriz alimentaria de donde fue obtenido cada uno de los aislados de *Salmonella*.

Para representar la procedencia de las muestras analizadas que se aislaron de distintas partes de la República Mexicana a cargo de la Red de Laboratorios Estatales de Salud Pública, se elaboró un mapa regido por una escala de color (de amarillo a verde) con ayuda de R y librerías de GoogleVis, empleando el archivo de entrada que contiene los códigos geográficos de los estados de la República Mexicana y el número de muestras que le corresponden a cada estado (Figura 4).

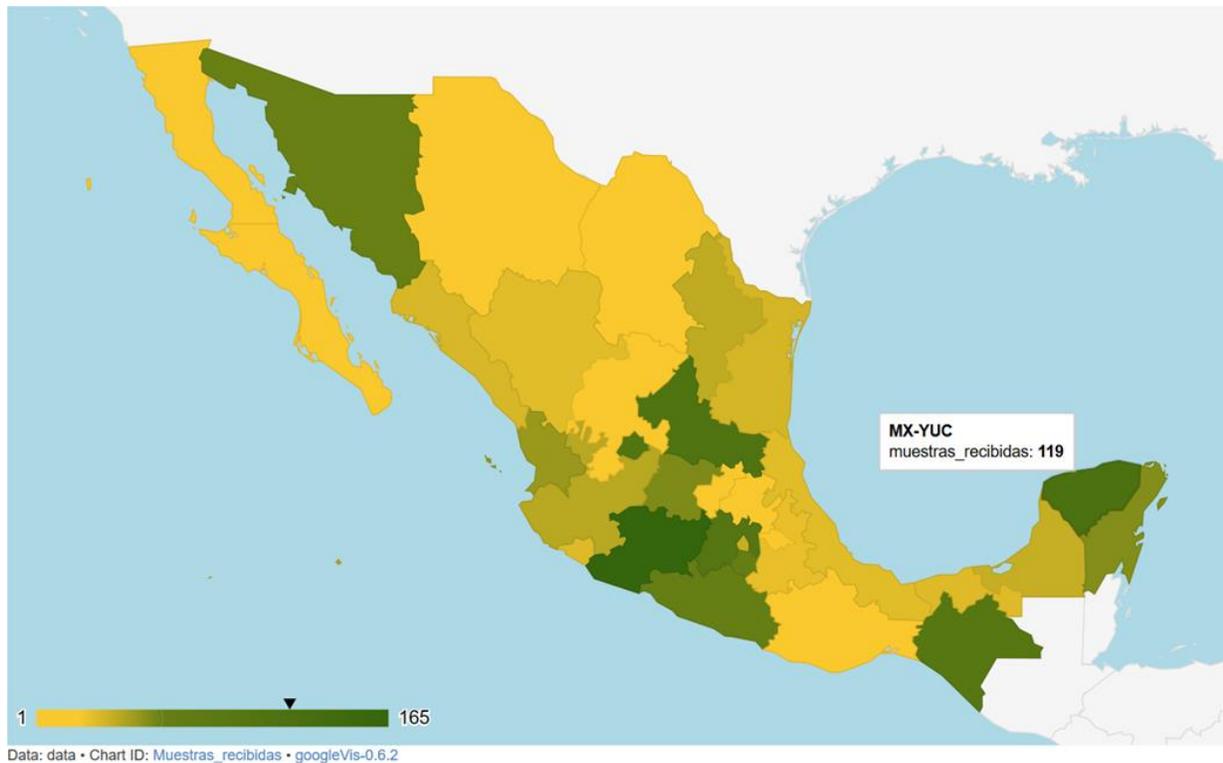


Figura 4. Mapa geográfico de la distribución de muestras de *Salmonella* recibidas y analizadas (1494) a lo largo de la República Mexicana regido por un gradiente de color (el amarillo representa un menor número de muestras recibidas mientras que el verde representa una mayor cantidad).

Los estados que proporcionaron más muestras de *Salmonella* fueron Michoacán (165 muestras), seguido por Yucatán (119 muestras, se resalta a manera de ejemplo) y San Luis Potosí (108 muestras). En cambio los estados que entregaron menos muestras fueron Coahuila (1 muestra), Baja California sur (7 muestras) y Baja California norte (8 muestras).

Para conocer la distribución geográfica de los serotipos aislados de *Salmonella* a lo largo de la República Mexicana, se elaboran mapas geográficos del territorio nacional para cada uno de los serotipos aislados de *Salmonella* (más adelante expuestos). Como se observa en el mapa de la figura 4, el número de muestras de *Salmonella* provenientes de los distintos estados del país que fueron remitidas a la SSB no fue homogéneo, para evitar un sesgo en los datos se optó por trabajar en proporciones aplicando el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{No. de aislados del serotipo "X" en el estado "Y"}}{\text{No. total de aislados del serotipo "X"}} \times 100$$

X = Es el serotipo a analizar de la base de datos de *Salmonella* de la SSB.

Y = Es el estado de la República mexicana que contiene cierto porcentaje de aislados del serotipo "X".

De los 1557 aislados de *Salmonella* secuenciados a cargo de la SSB, se les logró asignar serotipo a **1494**, de las cuales se identificaron en total **75 serotipos distintos** (Tabla 5).

Se analizaron solo las 1494 muestras de *Salmonella*, ya que para las 63 muestras restantes no fue posible asignar algún serotipo puesto que se mostraban inconsistencias entre los resultados de los software bioinformáticos empleados; una posible explicación a esto, es que estas muestras se encontraban contaminadas presentando distintos serotipos de *Salmonella* o incluso por bacterias que no pertenecen a este género; otra explicación que surgió tras encontrar que algunas de estas muestras sí expusieron una combinación alélica determinada, es que estas combinaciones aún no están registradas en las bases de datos utilizadas, esto abre a la idea de tener posibles serotipos novedosos de *Salmonella*, para determinar esto es necesario analizar estas cepas con otros software bioinformáticos para dictaminar con precisión.

Tabla 5. Lista de serotipos de *Salmonella* identificados en este trabajo (75 serotipos). Los 1494 aislados equivalen al 100 % de las muestras analizadas.

Serotipo	No. aislados	Serotipo	No. aislados	Serotipo	No. aislados
S. Typhimurium	165	S. Thompson	17	S. Corvallis	2
S. Anatum	143	S. Saintpaul	16	S. Falkensee	2
S. Derby	97	S. Schwarzengrund	14	S. li 48:D:Z6 (Hagenbeck)	2
S. Agona	96	S. Brandenburg	12	S. Manhattan	2
S. Infantis	68	S. Bredeney	12	S. Minnesota	2
S. Enteritidis	61	S. Cerro	10	S. Paratyphi_B	2
S. London	60	S. Poona	10	S. Reading	2
S. Newport	52	S. Mbandaka	9	S. Stanleyville	2
S. Give	48	S. Bovismorbificans	7	S. Alachua	1
S. Meleagridis	43	S. Rubislaw	7	S. Altona	1
S. Muenchen	42	S. Urbana	7	S. Bareilly	1
S. Braenderup	41	S. Ohio	6	S. Chester	1
S. Uganda	41	S. Heidelberg	5	S. Hartford	1
S. Senftenberg	40	S. Kiambu	5	S. lv 43:Z4,Z23:- (Houten)	1
S. Muenster	35	S. Soerenga	5	S. IV 45:G,Z51:-	1
S. Albany	32	S. Wassenaar	5	S. Krefeld	1
S. Panama	32	S. Worthington	5	S. Litchfield	1
S. Montevideo	29	S. Fresno	4	S. Livingstone	1
S. Rissen	27	S. Gaminara	4	S. Luciana	1
S. Adelaide	25	S. Irumu	4	S. Manchester	1
S. Weltevreden	24	S. Javiana	4	S. Molade	1
S. Kentucky	23	S. Liverpool	4	S. Oslo	1
S. Oranienburg	20	S. Sandiego	3	S. Ouakam	1
S. Havana	19	S. Sundsvall	3	S. Ruiru	1
S. Hadar	17	S. Tennessee	3	S. Saphra	1
Suma parcial 1	1280	Suma parcial 2	181	Suma parcial 3	33
Suma Total = 1494 aislados					

El serotipo que más se aisló en las muestras de *Salmonella* fue *S. Typhimurium* con el 11% de los aislamientos (165 aislados de *S. Typhimurium*/1,494 aislados totales), seguido por *S. Anatum* con el 9.6% (142/1494), *S. Derby* con el 6.5% (97/1494), *S. Agona* con el 6.4% (95/1494), *S. Infantis* con el 4.6% (68/1494) y *S. Enteritidis* con el 4.1% (61/1494). Los 69 serotipos restantes constituyen el 57.8% restante de los aislamientos, teniendo de manera individual un porcentaje de aislamiento menor al 4% (Figura 5).

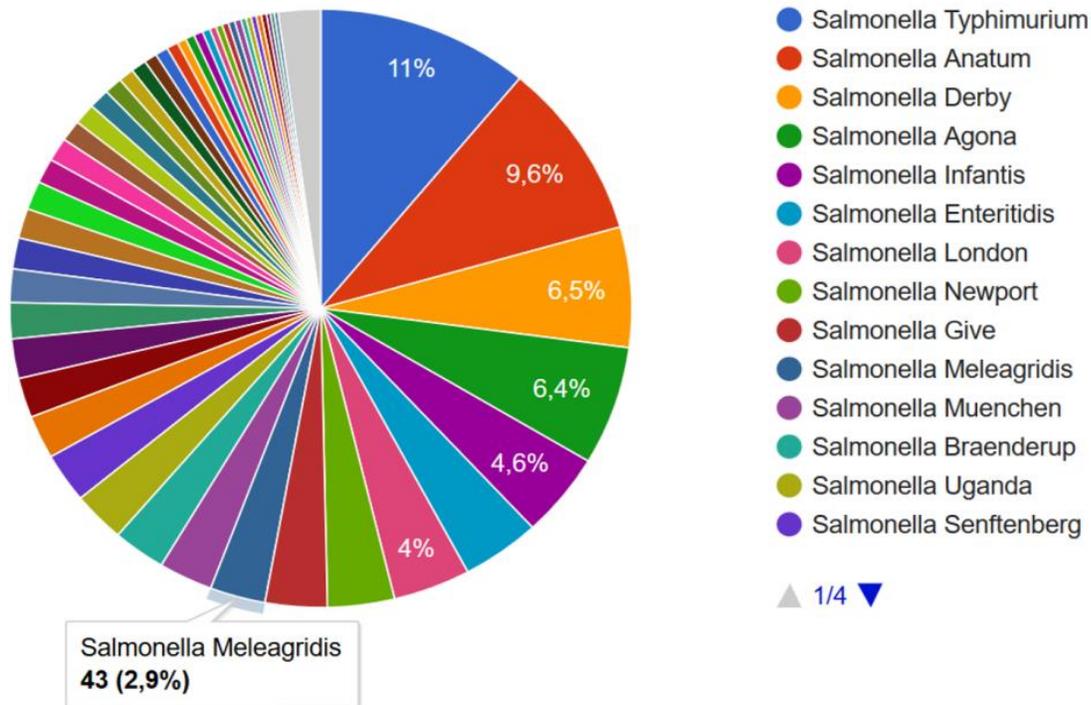


Figura 5. Distribución porcentual de los aislamientos de cada serotipo de *Salmonella* identificado por la SSB.

La Figura 6 muestra que de los 1494 aislados de *Salmonella* analizados, solamente uno no presentó genes de RAM; aproximadamente el 49.5% (740/1494) presentaron un gen, el 8.2% (123/1494) exhibieron dos genes y alrededor del 42.2% (630/1494) de los aislados expusieron más de tres genes de RAM. Es necesario resaltar que un aislado presentó 20 genes de resistencia.

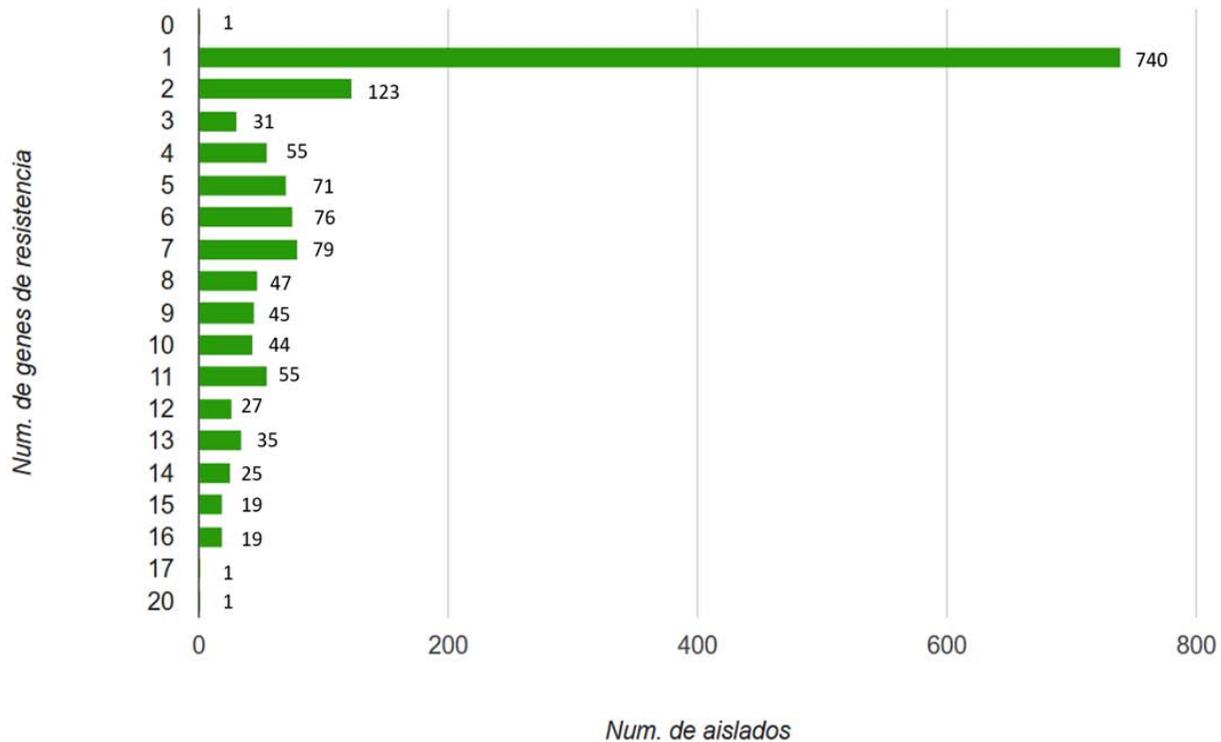


Figura 6. Gráfico del número de aislados de *Salmonella* de los 1494 analizados que poseen un determinado número de genes de RAM. Las medidas de tendencia central son: moda = 1, mediana = 2 y media aritmética = 4.179.

Lo anterior deriva al análisis que se expone más adelante (sección de resultados), donde se busca un patrón entre los genes de RAM que se reconocieron entre los aislados de *Salmonella* con respecto a los serotipos identificados, de tal manera que se pudiese hacer un perfil de resistencia a antimicrobianos a nivel de genes (*in Silico*) para cada serotipo de *Salmonella*.

El total de genes de RAM identificados en el presente trabajo fue de **6275 genes**, este valor considera a todas las muestras de *Salmonella* analizadas, no discriminando las cepas que compartan el mismo gen de resistencia. Se determinó que dentro de estos genes, **102 genes** eran distintos, es decir, un mismo gen pudiese estar considerado varias veces en el total de genes de RAM ya que se identificó en varias cepas analizadas. Dentro de estos genes distintos, 35 codifican para la resistencia a betalactámicos, 24 para aminoglucósidos, 9 tanto para trimetoprimas como para tetraciclinas, 8 para

fluoroquinolonas, 7 para fenicoles, 6 para macrólidos-lincosamidas-estreptograminas, 3 para sulfonamidas y 1 para fosfomicinas.

La Figura 7 muestra que, de los 6275 genes de RAM identificados en los 1494 aislados de *Salmonella*, el 45.1% de esos genes (2830/6275 genes totales) codifica para la resistencia a algún tipo de aminoglucósido, siendo esta clase antimicrobiana la más susceptible a ser inhibida por alguno de los aislados de *Salmonella*; a estos le siguen los genes que inhiben a las tetraciclinas con el 18.3% de los genes (1148/6275). Se observa que hay menos genes que codifican a la resistencia contra macrólidos-lincosamidas-estreptograminas y fosfomicinas con el 1.6% (100/6275) y el 0.2% (12/6275) respectivamente.

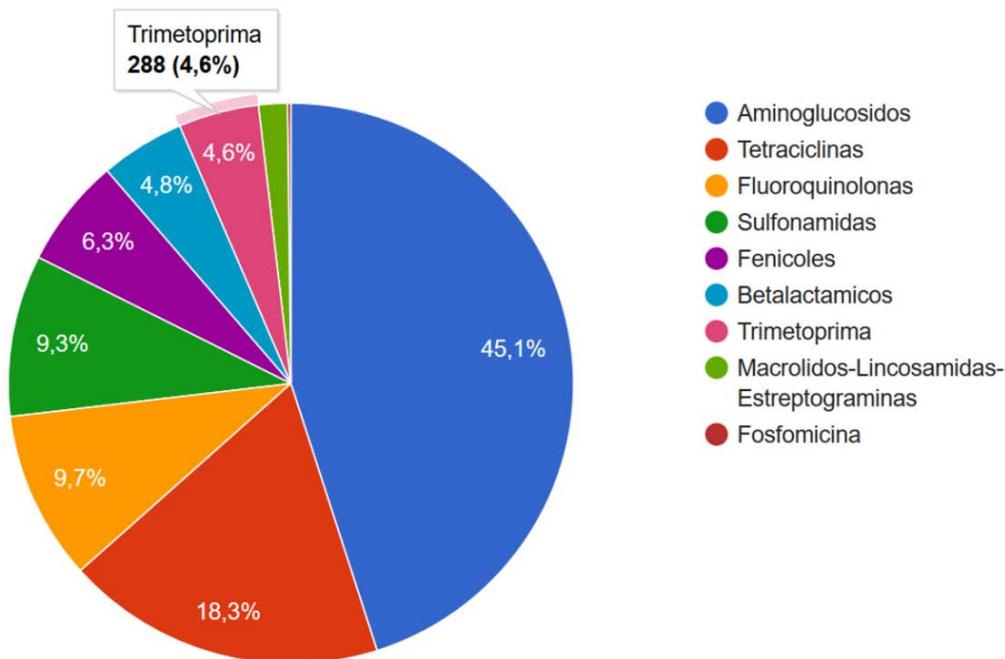


Figura 7. Frecuencia de genes de resistencia por familia antimicrobiana. El total de genes de RAM identificados en los aislados de *Salmonella* fue de 6260 genes.

Cabe destacar que no se encontró ningún gen de resistencia para colistina (polipéptido) o nitroimidazol, antimicrobianos que pueden ser utilizados para el tratamiento de patologías ocasionadas por *Salmonella* (Cué & Morejón, 1998); siendo éstos los antimicrobianos que posiblemente proporcionan el más adecuado y eficiente medicación para este patógeno.

El gráfico de la Figura 8, muestra que probablemente **594 cepas** de *Salmonella* (lo que equivale al **39.8%** de las muestras analizadas) serían multi-resistentes, ya que estos aislados presentan 3 o más genes de resistencia que codifican para 3 o más categorías antimicrobianas distintas, lo cual es el parámetro reportado en la literatura para considerar a una cepa de *Salmonella* multi-resistente (López *et al.*, 2011).

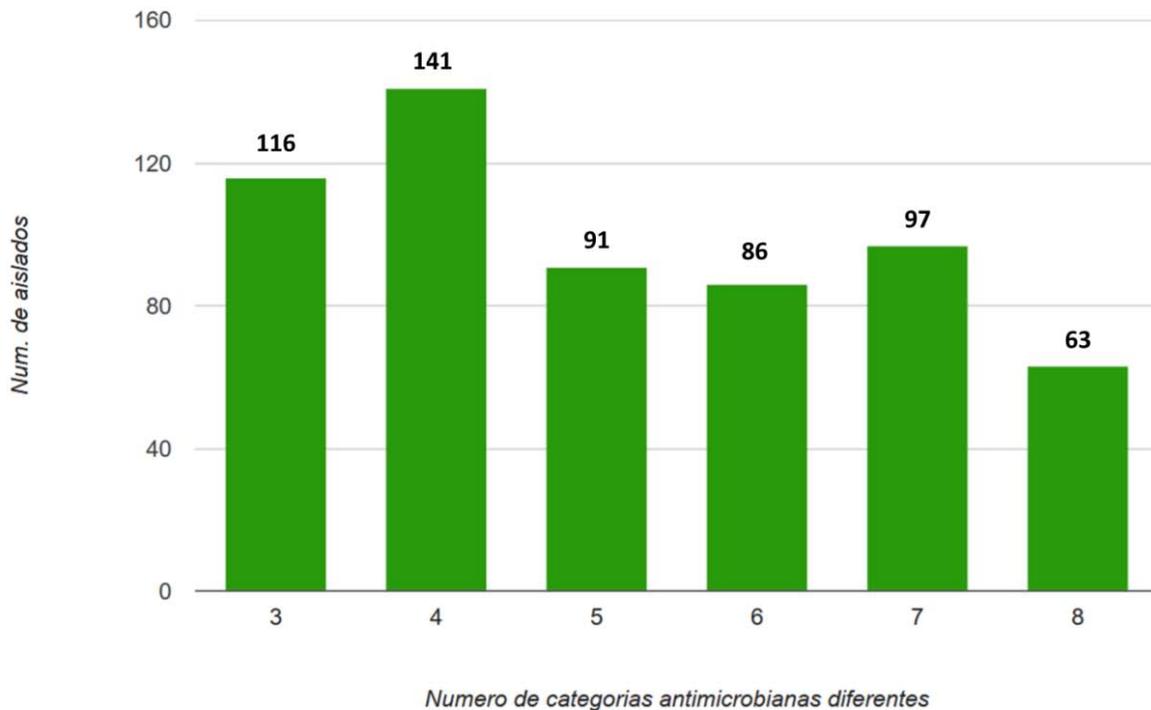


Figura 8. Número de cepas de *Salmonella* posiblemente multi-resistentes. Se consideran 594 cepas de los 1494 aislados de *Salmonella* analizados.

Para ejemplificar la información que contendrá el “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015-2017, secuenciación de genoma completo y genes de resistencia a antimicrobianos” para cada uno de los serotipos identificados, en el presente trabajo se muestran los resultados para los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Agona* y *S. Enteritidis*.

6.2 *Salmonella* Typhimurium.

6.2.1 ¿Quién es *Salmonella* Typhimurium?

Formula antigénica de *S. Typhimurium*:

Antígeno O:	1, 4, [5], 12
Antígeno H, fase 1:	i
Antígeno H, fase 2:	1,2

(Grimont, 2008).

Los principales reservorios de *S. Typhimurium* en animales son cerdos, aves de corral, ganado bovino e insectos. Con lo que respecta a alimentos, las principales fuentes de transmisión son carne de pavo, de cerdo y bovina (EFSA, 2010).

S. Typhimurium se distribuye a nivel global, se ha reportado que en muestras humanas es el segundo serotipo de *Salmonella* más frecuentemente aislado en EUA, la UE, África y América latina; mientras que en Australia es el serotipo más común y en Asia permanece dentro de los diez serovares más aislados (Cornell University, 2013).

El tamaño del genoma *S. Typhimurium* varía de 4.82 - 5.09 Mb dependiendo de la cepa, contiene aproximadamente el 52.2 % G+C y consta de 4,556 a 5,619 de genes predichos. La mayoría de las cepas de *S. Typhimurium* contienen un plásmido de aproximadamente 90 kb que porta genes de virulencia (plásmido de virulencia de *Salmonella*, SVP por sus siglas en inglés). En *S. Typhimurium* también se han identificado plásmidos grandes con regiones que codifican para resistencia a antimicrobianos de aprox. 200 kb (Ej. IncHI1). Las islas de patogenicidad (SPI por sus siglas en inglés) se encuentran en todas las cepas de *S. Typhimurium* secuenciadas hasta la fecha, esto incluye SPIs-1 a 6, 9, 11 a 14 y 16; siendo SPI-14 específica para *S. Typhimurium*. Las islas de patogenicidad que codifican para la resistencia a antibióticos parecen ser una característica común de varias cepas MDR (Multidrug Resistance) de *S. Typhimurium*, estas incluyen, por ejemplo, la isla genómica 1 de *Salmonella* (SGI1 por sus siglas en inglés) descrita en *S. Typhimurium* DT104 y la GI-DT12 en *S. Typhimurium* T000240. Esta última (GI-DT12) contiene genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, *oxa-30*, *aadA1*, *qacE?1*, *sul1*, *cat* y *tetA*).

En las regiones subsaharianas de África, existen de manera endémica cepas invasoras (que causan bacteremia) de *S. Typhimurium* (Cornell University, 2013). Por otra parte, Nayarit-Ballesteros et al. (2016) mencionan que la cepa de *S. Typhimurium* DT104 es la de mayor virulencia.

Distintos estudios indican la resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos por parte de *S. Typhimurium* (Tabla 6).

Tabla 6. Resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos por parte de *S. Typhimurium* con base a lo reportado por distintos autores.

Grupos de antimicrobianos	Tipos de antimicrobianos
Aminoglucósidos	Estreptomina ^{1,3} , Gentamicina ¹ , Kanamicina ¹ , Amikacina ¹ .
Betalactámicos	Penicilina ² , Ampicilina ^{1,3} , Amoxicilina-ácido clavulánico ¹ , cefalotina ¹ , Cefazolina ² , Ceftriaxona ³ .
Sulfonamidas	Trimetoprim-sulfametazol ¹ , Sulfonamida ¹ , Sulfisoxazol ³ .
Macrólidos	Eritromicina ² .
Fenicoles	Cloranfenicol ^{1,3} .
Tetraciclinas	Tetraciclinas ^{1,3} .
Quinolonas	Ácido nalidíxico ^{1,3} , Ciprofloxacino ² (fluoroquinolona).
Glicopéptidos	Vancomicina ² .

¹ Busani *et al*, 2004.

² Thung *et al*, 2018.

³ Andino & Hanning, 2015.

Debido a la gran diversidad, virulencia y distribución a nivel global este serotipo es frecuentemente asociado a brotes de salmonelosis. En mayo del 2010 en Francia,

provocó 90 casos de los cuales 20 fueron hospitalizados, esto debido al consumo de salchicha de cerdo deshidratada (EFSA, 2010).

En febrero del 2018, en EUA se reportó un brote de *S. Typhimurium* relacionado con ensalada de pollo y provocó 65 personas infectadas en 5 estados del país (CDC, 2018).

En la Tabla 7 se muestra el recuento de algunos brotes registrados de *S. Typhimurium* en distintas partes del mundo (Cornell University, 2013).

Tabla 7. Brotes registrados de *S. Typhimurium* por ingesta de alimentos en distintas partes del mundo.

Año	Localidad	Fuentes asociadas	Número de casos
2018	EUA – varios estados	Ensalada de pollo	65
2013	EUA - varios estados	Carne molida	22
2012	Canadá*	Carne molida	50
2012	EUA - varios estados	Melón cantalupo	261
2011	EUA - varios estados	Carne molida	20
2011	Inglaterra*	Cerdo	51
2011	Irlanda*	Huevos de pato	34
2010	Francia*	Salchicha de cerdo	90
2009	Inglaterra*	Desconocido	14

*No se especifica los estados o entidades del país que estuvieron implicados en el brote. (Cornell University, 2013).

6.2.2 *Salmonella Typhimurium* en México.

En México, González et al. (1985) reportaron que *S. Typhimurium* fue el principal serotipo de *Salmonella* aislado en muestras clínicas humanas entre los años 1974 - 1981 con el 45.7% (1,281 aislamientos de *S. Typhimurium*/2,803 de aislamientos totales); en

alimentos ocupó el tercer lugar con el 8.9% de aislamientos (144/1,619) y en animales ocupó el séptimo lugar con el 3.2% de aislamientos (1/31). Indagando sobre las muestras clínicas humanas donde se encontró *S. Typhimurium*, la procedencia de éstas eran de pacientes hospitalizados, además de que se observó que frecuentemente se aislaba en hospitales que en laboratorios clínicos privados, una posible respuesta a esto es el grado de virulencia que posee este patógeno; por lo regular *S. Typhimurium* se aísla cuando se presenta una patología y por ende se le da seguimiento en hospitales, en cambio en laboratorios clínicos privados no necesariamente el seguimiento microbiológico sea debido a la existencia de una patología, sino porque la mayor parte de las veces son estudios de rutina. Las cepas de *S. Typhimurium* procedentes de hospitales mostraron mayor resistencia a antimicrobianos que las que provenían de otros laboratorios clínicos privados. Este serotipo no se aisló en aguas de drenaje.

Gutiérrez-Cogco et al. (2000) respaldaron que entre los años 1982 y 1999 en México, *Salmonella Typhimurium* predominó como el serotipo de *Salmonella* que más se aisló en muestras clínicas humanas, reportaron que el 20.4% de aislamientos corresponden a este serotipo (3,225/15,843).

6.2.3 *Salmonella Typhimurium* en el mundo.

En EUA, *S. Typhimurium* se reporta como el serovar más común con el 19.8% de aislamientos (951/4,794) en muestras de origen no humano, en cuanto a aislamientos en muestras clínicas humanas ocupa el segundo lugar con el 11.6% (5,704/49,004) (CDC, 2012).

En la UE se reporta que es el segundo serotipo de *Salmonella* más frecuente en casos clínicos humanos con el 20.2% de aislamientos (16,705/82,694) (EFSA, 2015).

6.2.4 Resultados obtenidos para *S. Typhimurium*.

De los 1494 aislados de *Salmonella* analizados, 165 se identificaron como *S. Typhimurium*, por lo que es el serotipo con mayor frecuencia de aislamientos (11%) (Figura 5).

Los aislamientos de *S. Typhimurium* proceden de todo el territorio nacional (Figura 9), se observa que la mayor parte de los aislamientos proceden de la parte central del país, particularmente en el Estado de México con el 10.9%, seguido por San Luis Potosí con el 9.7% y por Michoacán con el 9.1% (Tabla 8).

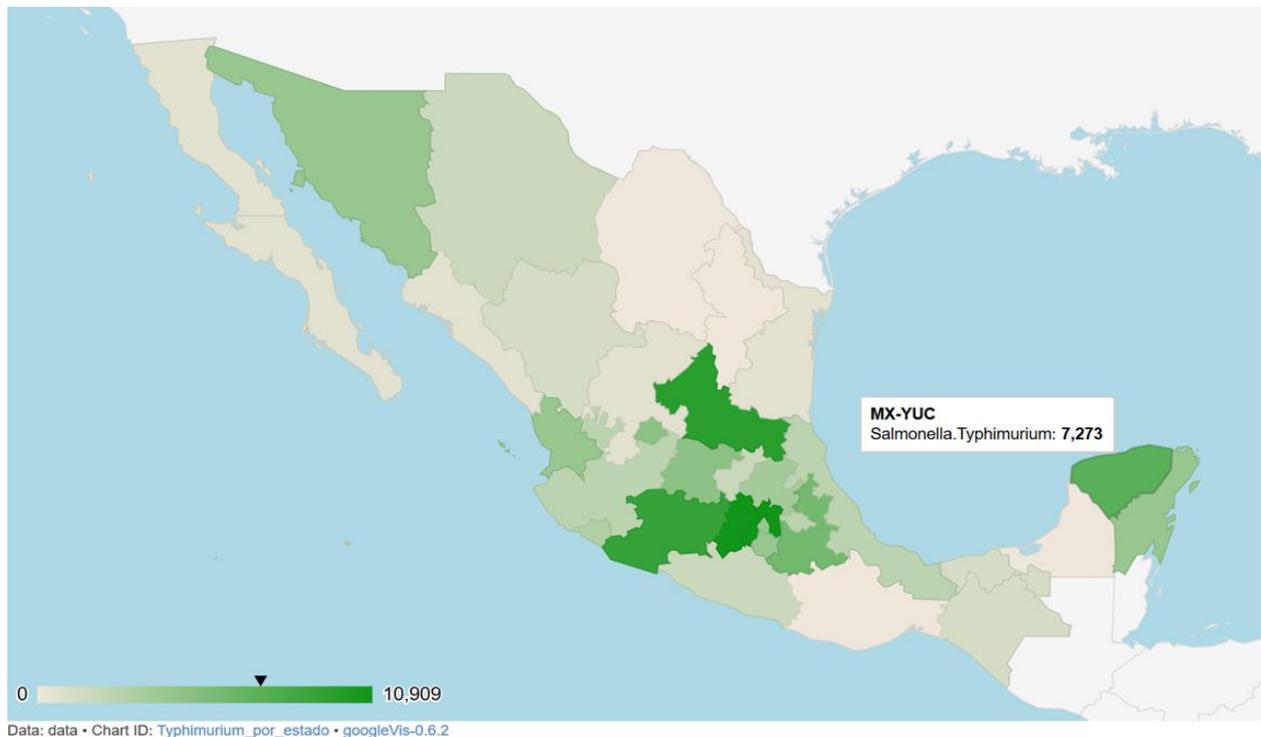


Figura 9. Mapa de distribución geográfica de *S. Typhimurium* a lo largo del territorio nacional. El mapa está regido por una escala de color, donde el verde intenso corresponde al estado con mayor porcentaje de predominancia de *S. Typhimurium*.

Tabla 8. Porcentajes de distribución geográfica de *S. Typhimurium*.

Estados	% de aislados de <i>S. Typhimurium</i>	Estados	% de aislados de <i>S. Typhimurium</i>
Edo. de México	10,9	Jalisco	2,4
San Luis Potosí	9,7	Tlaxcala	2,4
Michoacán	9,1	Veracruz	2,4
Yucatán	7,3	Chihuahua	1,8
Puebla	6,1	Guerrero	1,8
Aguascalientes	4,8	Querétaro	1,8
Guanajuato	4,8	Chiapas	1,2
Ciudad de México	4,2	Durango	1,2
Morelos	4,2	Tabasco	1,2
Nayarit	4,2	Baja California Norte	0,6
Quintana Roo	4,2	Baja California Sur	0,6
Sonora	4,2	Sinaloa	0,6
Hidalgo	3,6	Tamaulipas	0,6
Colima	3,0	Zacatecas	0,6

Con el análisis de hq-SNPs entre la totalidad de los aislados de *S. Typhimurium*, se construyó el árbol filogenético (Figura 10) y la matriz de hq-SNPs (Figura 11).

Se muestra sólo un fragmento de la matriz de comparación pareada de hq- SNPs (Figura 11) ya que la dimensión ésta es demasiado extensa. Se calculó la diferencia de SNPs entre pares de cepas para todas las muestras pertenecientes a este serotipo, de tal forma que entre mayor sea el número de SNPs (los valores sombreados de color azul), la diferencia génica será mayor; pero si el número de SNPs es menor (sombreado de color rojo), la diferencia génica también lo será, siendo este el caso de clonalidad del par de cepas analizadas.

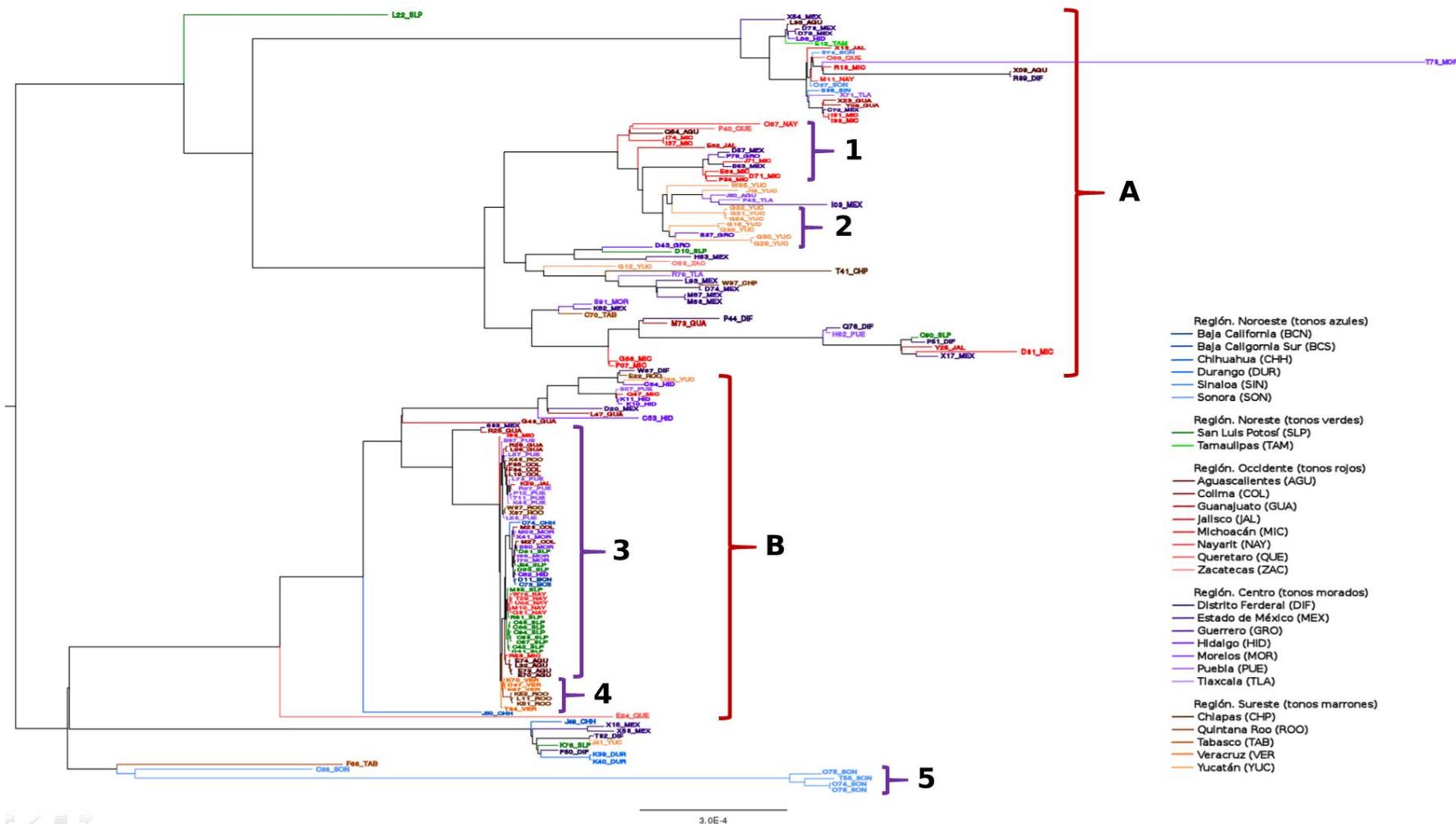


Figura 10. Árbol filogenético de *S. Typhimurium* construido a partir de la comparación pareada de hq-SNPs entre los aislados de este serotipo. La longitud de las líneas horizontales del árbol filogenético está dada por la diferencia de SNPs que tienen entre sí los aislados. Los colores están dados por las regiones geográficas (Noroeste, noreste, occidente, centro y sureste) de donde se extrajeron los aislados de *S. Typhimurium*. Se resaltan las agrupaciones en llaves de color morado y se le asigna un número a cada agrupación. Se resalta con rojo y se le asigna una letra (A y B) a los grupos monofiléticos encontrados de *S. Typhimurium*.

.	C36	C41	C42	C43	C52	C53	C54	C66	C67	C68	C70	C72	C73	C74	C90	C94	D10	D11	D20	D43	D51	D57	D71
C36	-	441	442	429	440	468	471	431	432	422	490	414	442	451	452	429	481	446	490	477	433	497	502
C41	441	-	-	-	6	177	178	-	-	-	565	474	6	12	520	1	555	7	196	549	6	571	573
C42	442	-	-	-	6	177	180	-	-	-	565	475	6	12	521	1	555	7	196	549	6	574	576
C43	429	-	-	-	6	176	178	-	-	-	558	472	6	12	519	1	547	7	195	543	6	565	567
C52	440	6	6	6	-	180	183	6	6	6	567	478	-	10	524	7	554	1	199	552	-	574	578
C53	468	177	177	176	180	-	132	171	172	169	593	500	179	188	545	174	582	182	68	578	176	598	599
C54	471	178	180	178	183	132	-	175	175	171	730	508	182	190	679	177	718	185	69	687	179	659	659
C66	431	-	-	-	6	171	175	-	-	-	552	473	6	12	516	1	540	7	190	542	6	562	563
C67	432	-	-	-	6	172	175	-	-	-	547	470	6	12	516	1	537	7	192	540	6	557	559
C68	422	-	-	-	6	169	171	-	-	-	542	471	6	12	513	1	533	7	187	537	6	553	555
C70	490	565	565	558	567	593	730	552	547	542	-	282	566	571	66	552	143	566	614	93	550	109	120
C72	414	474	475	472	478	500	508	473	470	471	282	-	476	483	279	473	280	479	518	287	475	265	271
C73	442	6	6	6	-	179	182	6	6	6	566	476	-	10	523	7	556	1	198	550	-	576	579
C74	451	12	12	12	10	188	190	12	12	12	571	483	10	-	528	13	560	11	206	556	10	580	582
C90	452	520	521	519	524	545	679	516	516	513	66	279	523	528	-	517	80	525	561	93	520	99	109
C94	429	1	1	1	7	174	177	1	1	1	552	473	7	13	517	-	543	8	194	544	7	561	560
D10	481	555	555	547	554	582	718	540	537	533	143	280	556	560	80	543	-	556	602	65	544	116	127
D11	446	7	7	7	1	182	185	7	7	7	566	479	1	11	525	8	556	-	201	552	1	577	579
D20	490	196	196	195	199	68	69	190	192	187	614	518	198	206	561	194	602	201	-	598	196	622	622
D43	477	549	549	543	552	578	687	542	540	537	93	287	550	556	93	544	65	552	598	-	546	102	112
D51	433	6	6	6	-	176	179	6	6	6	550	475	-	10	520	7	544	1	196	546	-	562	564
D57	497	571	574	565	574	598	659	562	557	553	109	265	576	580	99	561	116	577	622	102	562	-	50
D71	502	573	576	567	578	599	659	563	559	555	120	271	579	582	109	560	127	579	622	112	564	50	-

Figura 11. Fragmento de la matriz de comparación pareada de hq-SNPs de *S. Typhimurium*. En color rojo, se tiene el cotejo de las cepas que muestran menos o un SNP; en color rosa-blanco, se tiene el cotejo de las cepas que muestran entre 2 - 7 SNPs; y en color azul, se tiene el cotejo de las cepas que muestran más de 8 SNPs.

El árbol filogenético de *S. Typhimurium* (Figura 10) muestra la existencia de dos grupos monofiléticos (clados) marcadamente distintos entre las cepas analizadas de este serovar (agrupación A y B). El grupo A muestra mayor diversidad entre las cepas que lo componen, consta de una diferencia aproximada de 300 SNPs entre ellas, esto puede deberse a la alta comercialización de productos de origen animal a lo largo del territorio nacional e incluso que haya cepas provenientes de otros países debido a la importación de muchos productos de este tipo. En cambio, el grupo B es más homogéneo, la mayoría de las cepas que lo componen difieren entre ellas en aproximadamente 10 SNPs, lo cual evidencia que la mayor parte de estas cepas son clonales (Figura 11); un aspecto interesante de este grupo es que las cepas provienen de distintas regiones del país, lo que apunta a una probable propagación por parte de una determinada cepa de *S. Typhimurium* y que ha colonizado ciertas zonas geográficas del país. La existencia de estos dos grupos expone un posible escenario, que en el país existen mínimo dos subtipos de *Salmonella Typhimurium*, lo cual se debería de comparar con secuencias de cepas aisladas antiguamente o incluso internacionales para corroborar si estos subtipos han prevalecido en el país o que tengan procedencia de otra parte del mundo.

Dentro de cada uno de los grupos mencionados, se forman agrupaciones que están asociadas con la procedencia de las muestras de *S. Typhimurium*; la agrupación 2 del grupo monofilético A, se compone principalmente de muestras que provienen del sureste del país, éstas cepas solo muestran 3 SNPs de diferencia lo que refleja que son cepas clonales. La agrupación 3 del grupo monofilético B, se caracteriza por componerse de cepas de distintos estados de la republica pero concentrándose mayormente en estados del centro-occidente-noreste del país (región geográfica donde se obtuvieron mayores aislamientos de *S. Typhimurium* como se observa en la Figura 9), las diferencias de SNPs mostradas por esta agrupación son de aproximadamente 10 SNPs, este valor es bajo lo que indica que se trata de cepas clonales que se han distribuido a lo largo de los estados de la región centro-occidente-noreste del territorio nacional. Esto mismo se presenta en las agrupaciones 1 (región occidente), 4 (región sureste) y 5 (región noroeste).

Tras identificar los genes de RAM mostrados por las cepas analizadas de *S. Typhimurium*, se obtuvo como resultado la posible resistencia a distintos grupos de antimicrobianos mostrados en la Figura 12.

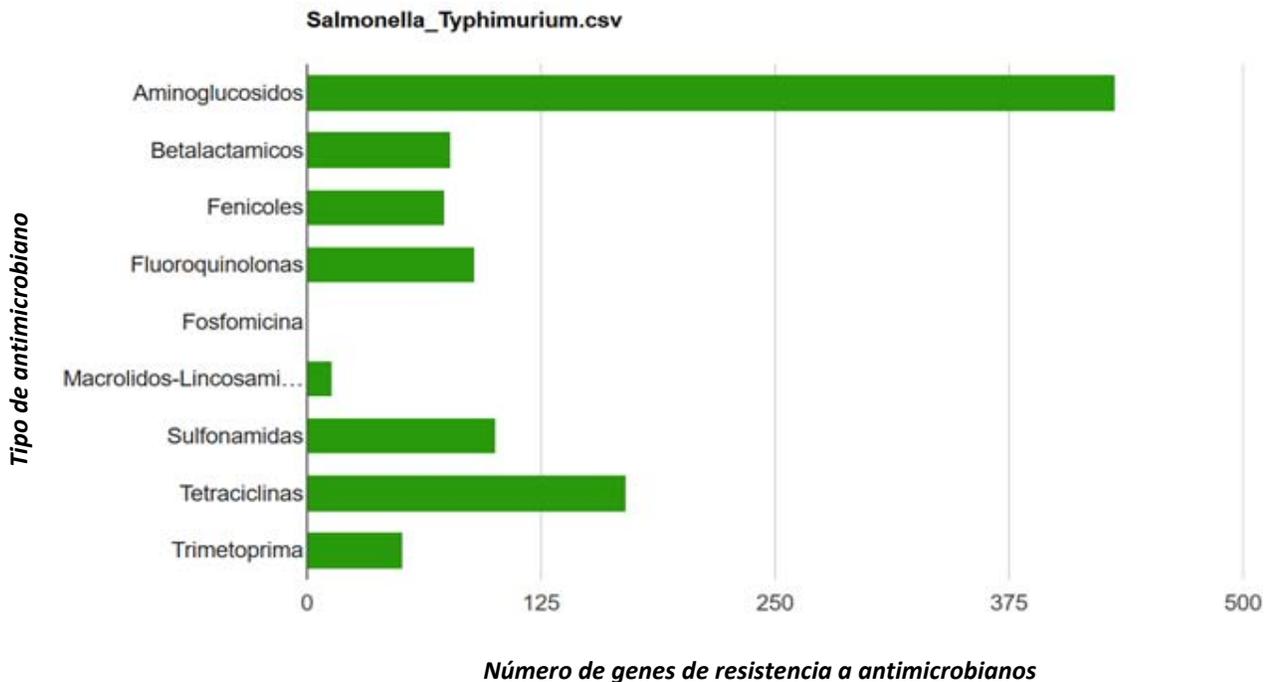


Figura 12. Número de genes de resistencia por categoría antimicrobiana que presenta *S. Typhimurium*.

El gráfico de la Figura 12 muestra que el mayor número de genes de resistencia que se presenta entre los aislados de *S. Typhimurium* es la categoría de aminoglucósidos (432 genes repartidos entre los 165 aislados de *S. Typhimurium* codifican para la resistencia a este antimicrobiano), seguido por el grupo de las tetraciclinas (171 genes repartidos entre los 165 aislados de *S. Typhimurium* codifican para la resistencia a este antimicrobiano).

La Figura 12 expone cepas de *S. Typhimurium* resistentes a trimetoprima, lo cual no se encontró reportado por otros autores hasta donde nos fue posible investigar (Busani *et al*, 2004; Thung *et al*, 2018; Andino y Hanning, 2015). Este estudio también difiere en que

no se identificaron cepas de este serovar resistentes a glicopéptidos como lo menciona Thung et al. (2018).

Salmonella Typhimurium en este trabajo fue el serotipo con mayor número de aislamientos en alimentos de origen animal durante el período comprendido de 2015 – 2017 en México. Se encuentra distribuido a lo largo del territorio nacional concentrándose principalmente en el centro del país y presenta muy poca diversidad interna. Se identificaron dos grupos monofiléticos donde uno de ellos (B) principalmente se compone por cepas del centro-occidente-noreste del país. Muestra resistencia a una amplia gama de familias de antimicrobianos, pero lo que resulta relevante es que se identifican cepas resistentes a trimetoprima.

6.3 *Salmonella* Agona.

6.3.1 ¿Quién es *Salmonella* Agona?

Formula antigénica de *S. Agona*:

Antígeno O:	1, 4, [5], 12
Antígeno H, fase 1:	f, g, s
Antígeno H, fase 2:	[1,2]

(Grimont, 2008).

Los principales reservorios de *Salmonella* Agona en animales son las aves de corral (*Gallus*), seguidos por el ganado bovino, cerdos y ovejas. En cuanto a las principales fuentes de transmisión de este serotipo en alimentos, se encuentran la carne de cerdo, de pollo y de ganado bovino (EFSA, 2018).

La distribución geográfica de *S. Agona* abarca América del Norte, América del Sur, Europa y Asia. En China, se encuentra entre los diez serovares más comúnmente aislados (Cornell University, 2013).

El tamaño del genoma de *S. Agona* varía de 4,70 a 4,95 Mb dependiendo de la cepa, contiene el 52 % G+C y consta de 4,658 a 4,934 genes predichos. *S. Agona* posee un genoma accesorio de aproximadamente 1.3 Mb; que incluye profagos múltiples (similar a P2, similar a Fels, similar a Lambda), plásmidos de resistencia a antibióticos (por ejemplo, plásmidos Inc11), islas de patogenicidad, transposones, e integrones cromosómicos (Cornell University, 2013).

Un estudio realizado por Thung et al. (2018), señala la existencia de cepas de *S. Agona* resistentes a algunos grupos de antimicrobianos, éstas se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resistencia a algunos grupos de antimicrobianos por parte de *S. Agona* con base a lo reportado por Thung et al. (2018).

Grupos de antimicrobianos	Tipos de antimicrobianos
Betalactámicos	Penicilina, Ampicilina
Macrólidos	Eritromicina
Glicopéptidos	Vancomicina

En el mes de agosto del 2017, en UE un brote relacionado a fórmula infantil (leche en polvo) afectó a 39 lactantes (niños <1 año de edad): 37 en Francia, uno en España y uno en Grecia, confirmados por secuenciación de genoma completo (EFSA, 2018).

Este serotipo se vinculó con los brotes relacionados con las papayas mexicanas exportadas a EUA en 2017 (FDA, 2017).

En la Tabla 10 se muestra el recuento de algunos brotes registrados de *S. Agona* en distintas partes del mundo.

Tabla 10. Brotes registrados de *S. Agona* por ingesta de alimentos en distintas partes del mundo.

Año	Localidad	Fuente asociada	Número de Casos
2017	Francia*, España* y Grecia*	Formula infantil	39
2017	EUA - varios estados	Papayas mexicanas	201
2011	EUA - varios estados	Papayas importadas	106
2008	EUA - varios estados	Arroz y cereal de sople de trigo	28
2008	Europa (6 países)**	Carne y emparedado.	148
2008	Europa**	Carne	119
2004	Francia*	Formula infantil	141
2002	Alemania*	Té, anís a base de hierbas	42
1998	EUA - varios estados	Cereal de avena tostada	209

*No se especifica los estados o entidades donde se presentó el brote.

**No se especifica en que países ni estados se presentó el brote.

(Cornell University, 2013; FDA, 2017).

6.3.2 *Salmonella* Agona en el México.

En México durante el período de 1940 a 1962, no se resguardan registros de aislamientos de este serovar (Olarte & Varela, 1964), pero a partir de 1972 el aislamiento de *S. Agona* mostró aumentar en frecuencia. Entre los años de 1974 y 1981 se registraron un mayor número de aislamientos, los cuales provenían de muestras clínicas humanas ocupando el cuarto lugar entre los serotipos más aislados con el 4.6% (129 aislamientos de *S. Agona*/2,803 de aislamientos totales), en alimentos ocupó el quinto lugar con el 4.3% (70/1,619) y en aguas de drenaje se posicionó en el segundo lugar con el 17.4% (12/69) (González *et al*, 1985).

6.3.3 *Salmonella* Agona en el Mundo.

En EUA, *S. Agona* es el tercer serovar más aislado en muestras de origen no humano con el 5.1% (245/4,794). Por otra parte, es el décimo noveno serotipo de *Salmonella* más frecuentemente aislado en muestras humanas con el 0.7% de los aislamientos (339/49,004) (CDC, 2012).

Mientras tanto en UE, *S. Agona* es el décimo serotipo de *Salmonella* más comúnmente aislado de muestras clínicas humanas; en el período 2012-2016, 26 países de la UE informaron un número anual de casos que van de 400 a 581. El Reino Unido, Alemania y Francia representaron la mayor proporción de casos confirmados (30%, 16% y 14%, respectivamente) durante este período. Los casos fueron más frecuentes entre los adultos en el grupo de edad de 25-44 años (23%) y los niños por debajo de cinco años (22%) (EFSA, 2018).

6.3.4 Resultados obtenidos para *S. Agona*.

Para este trabajo, de los 1494 aislados de *Salmonella* analizados, 96 se identificaron como *S. Agona*, siendo el cuarto serotipo mayormente aislado en alimentos de origen animal en México con el 6.4% (Figura 5).

En cuanto a la distribución geográfica de *S. Agona* en México, se muestra en la Figura 13 que este serotipo se aisló con mayor frecuencia en los estados de San Luis Potosí y Yucatán con el 12.5% y 11.5% respectivamente, seguidos por el estado de Michoacán con el 10.4% y los estados de Sonora y Estado de México con el 7.3% para cada caso (Tabla 11).



Figura 13. Mapa de distribución geográfica de S. Agona a lo largo del territorio nacional.

Tabla 11. Porcentajes de distribución geográfica de S. Agona.

Estados	% de aislados de S. Agona	Estados	% de aislados de S. Agona
San Luis Potosí	12.5	Sinaloa	4.2
Yucatán	11.5	Tamaulipas	4.2
Michoacán	10.4	Aguascalientes	3.1
Edo. de México	7.3	Morelos	3.1
Sonora	7.3	Querétaro	3.1
Campeche	6.3	Ciudad de México	2.1
Chiapas	5.2	Jalisco	2.1
Guerrero	5.2	Nuevo León	2.1
Colima	4.2	Quintana Roo	1.0
Guanajuato	4.2	Tabasco	1.0

La Figura 13 muestra tres corredores de distribución geográfica muy marcados de *S. Agona*, uno en la parte noroeste, el otro en el noreste-occidente-centro y el último en el sureste del país. Dentro de estos corredores se encuentran los estados que presentaron mayor porcentaje de predominancia por parte *S. Agona* (San Luis Potosí, Yucatán, Michoacán y Sonora).

Los resultados provenientes de la comparación pareada de *hq*-SNPs entre las cepas de *S. Agona* se muestran en las Figuras 14 (árbol filogenético) y 15 (matriz).

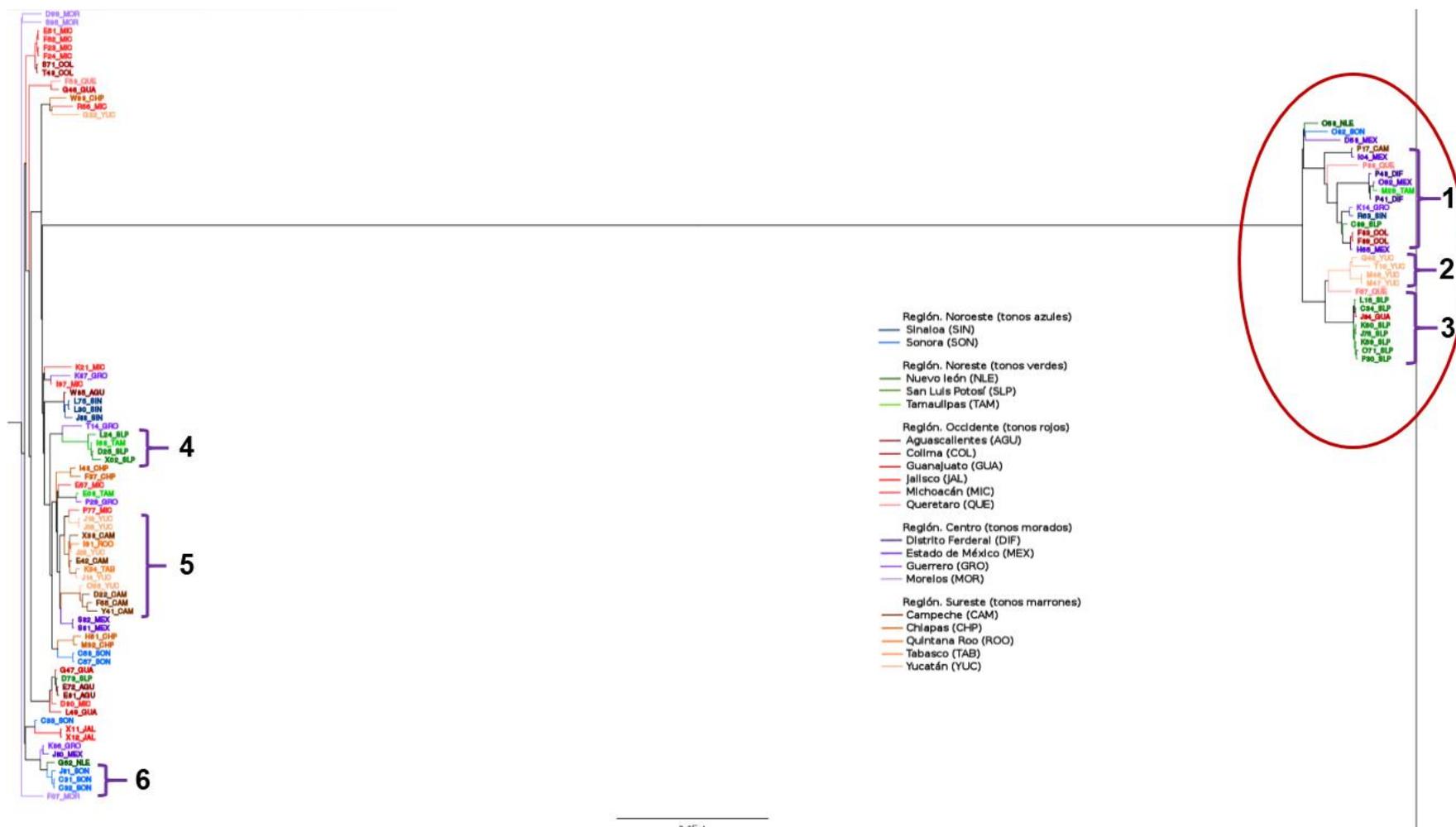


Figura 14. Árbol filogenético de *S. Agona* construido a partir de la comparación pareada de *hq*-SNPs entre los aislados de este serotipo. La longitud de las líneas del árbol filogenético está dada por la diferencia de SNPs que tienen entre si los aislados. Los colores están dados por las regiones geográficas (Noroeste, noreste, occidente, centro y sureste) de donde se obtuvieron los aislados de *S. Agona*. Se resaltan las agrupaciones llaves de color morado y se le asigna un número a cada agrupación. Se resalta con rojo el grupo marcadamente distinto de *S. Agona* encontrado.

.	C31	C32	C33	C34	C57	C58	C89	D22	D25	D58	D73	D80	D99	E08	E42	E51	E57	E72	E81	F07	F23	F24	F37
C31	-	-	45	1445	72	73	1393	82	72	1398	63	62	50	72	60	46	69	65	67	58	47	48	82
C32	-	-	16	643	23	23	630	28	21	615	18	17	17	15	10	12	19	19	19	16	12	12	25
C33	45	16	-	1453	56	56	1391	64	55	1403	44	44	35	61	44	27	51	45	48	39	28	29	65
C34	1445	643	1453	-	1449	1449	81	1461	1437	89	1414	1430	1328	1302	1312	1447	1408	1433	1468	1466	1451	1447	1465
C57	72	23	56	1449	-	-	1388	59	52	1404	64	65	61	45	39	51	40	64	67	63	53	53	52
C58	73	23	56	1449	-	-	1393	58	53	1403	65	65	61	44	38	51	39	65	68	63	53	53	51
C89	1393	630	1391	81	1388	1393	-	1403	1388	66	1354	1367	1288	1241	1252	1383	1342	1365	1400	1401	1387	1388	1400
D22	82	28	64	1461	59	58	1403	-	59	1416	68	73	61	45	35	63	46	78	79	75	64	65	60
D25	72	21	55	1437	52	53	1388	59	-	1394	66	67	59	52	39	52	48	67	69	66	53	54	60
D58	1398	615	1403	89	1404	1403	66	1416	1394	-	1389	1400	1308	1280	1268	1401	1367	1392	1421	1416	1403	1401	1423
D73	63	18	44	1414	64	65	1354	68	66	1389	-	8	50	64	54	41	59	-	2	52	42	42	72
D80	62	17	44	1430	65	65	1367	73	67	1400	8	-	50	66	57	42	61	9	11	52	43	42	74
D99	50	17	35	1328	61	61	1288	61	59	1308	50	50	-	63	48	36	56	50	52	43	37	38	68
E08	72	15	61	1302	45	44	1241	45	52	1280	64	66	63	-	31	59	31	65	66	69	60	59	47
E42	60	10	44	1312	39	38	1252	35	39	1268	54	57	48	31	-	44	27	56	58	54	45	45	38
E51	46	12	27	1447	51	51	1383	63	52	1401	41	42	36	59	44	-	48	41	44	35	1	1	61
E57	69	19	51	1408	40	39	1342	46	48	1367	59	61	56	31	27	48	-	61	62	58	50	48	40
E72	65	19	45	1433	64	65	1365	78	67	1392	-	9	50	65	56	41	61	-	2	53	42	42	74
E81	67	19	48	1468	67	68	1400	79	69	1421	2	11	52	66	58	44	62	2	-	55	45	45	76
F07	58	16	39	1466	63	63	1401	75	66	1416	52	52	43	69	54	35	58	53	55	-	36	36	72
F23	47	12	28	1451	53	53	1387	64	53	1403	42	43	37	60	45	1	50	42	45	36	-	-	62
F24	48	12	29	1447	53	53	1388	65	54	1401	42	42	38	59	45	1	48	42	45	36	-	-	60
F37	82	25	65	1465	52	51	1400	60	60	1423	72	74	68	47	38	61	40	74	76	72	62	60	-

Figura 15. Fragmento de la matriz de comparación pareada de hq-SNPs de *S. Agona*. En color rojo, se tiene el cotejo de las cepas que muestran menos o un SNP; en color rosa-blanco, se tiene el cotejo de las cepas que muestran entre 2 - 7 SNPs; y en color azul, se tiene el cotejo de las cepas que muestran más de 8 SNPs.

El árbol filogenético de *S. Agona* (Figura 14) pone en evidencia a un clado marcadamente distinto del resto de los aislados analizados (resaltado por un círculo rojo), esto con base en la diferencia de SNPs entre las cepas pertenecientes a este grupo con respecto a las demás, se separan aproximadamente 1300 SNPs (Figura 15). Este resultado abre las puertas a varios escenarios, uno de ellos es que este grupo sobresaliente puede que sea de reciente inserción en el país por lo que explicaría la alta diferencia génica de estas cepas con respecto a las demás, sería necesario comparar las secuencias de este grupo con secuencias internacionales para rastrear si efectivamente provienen de otra parte del mundo o en todo caso, que sea un subtipo de *Salmonella Agona* endémica del país.

Por otra parte, se presentan ciertas asociaciones entre las cepas del mismo serotipo las cuales también están regidas por las diferencias de SNPs. Cada una de estas asociaciones se relaciona con alguno de los tres corredores expuestos anteriormente (Figura 13), por ejemplo, la asociación 6 del árbol filogenético (resaltada con color morado) pertenece al corredor del noroeste, al observar el número de diferencia de SNPs y la procedencia geográfica de cada una de las cepas se podría pensar en cepas clonales. Por otro lado, las asociaciones 1, 3 y 4 del árbol filogenético corresponden al corredor noreste-occidente-centro del país; las asociaciones 1 y 3 pertenecen al grupo monofilético que se encuentra más alejado del resto de las cepas, tienen la característica de haber sido aisladas en el noreste-centro del país, lo cual evidencia la propagación génica de estas cepas a lo largo de este corredor geográfico; la asociación 4 es un grupo puntual de cepas en la parte noreste. Por último, se menciona a las asociaciones 2 y 5 pertenecientes al corredor del sureste, de igual forma se observa que para cada caso son pocas las diferencias de SNPs y tras provenir de una región geográfica similar, es posible que estas asociaciones sean cepas clonales.

Los resultados obtenidos con respecto a la identificación de genes que codifican para la resistencia a distintos grupos de antimicrobianos en las cepas analizadas de *S. Agona* se muestran en la Figura 16.

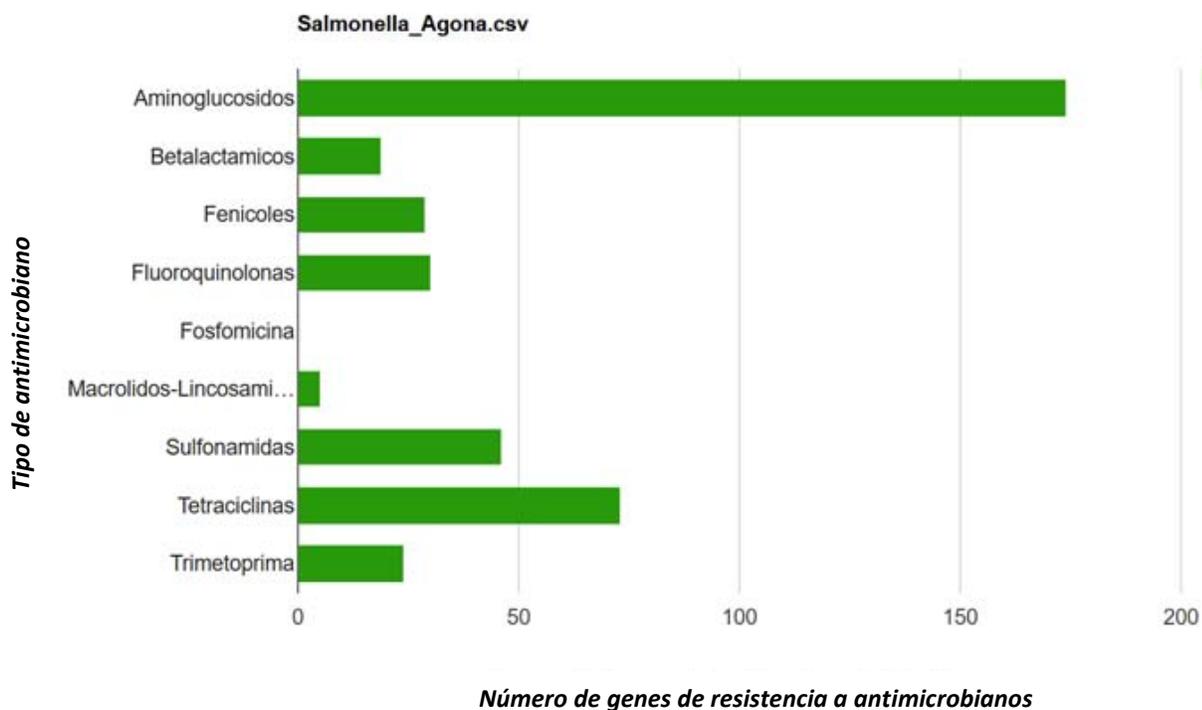


Figura 16. Número de genes de resistencia a ciertos grupos de antimicrobianos para S. Agona.

El gráfico de la Figura 16 muestra que de igual manera que *S. Typhimurium*, el mayor número de genes de resistencia que se presenta en los aislados de *S. Agona* es al grupo de aminoglucósidos (174 genes repartidos entre los 96 aislados de *S. Agona* codifican para la resistencia a este antimicrobiano), seguido por el grupo de las tetraciclinas (73 genes repartidos entre los 96 aislados de *S. Agona* codifican para la resistencia a este antimicrobiano).

La Figura 16, además nos expone que se tienen cepas de *S. Agona* resistentes a antimicrobianos que anteriormente no se habían reportado, esto con base en el estudio realizado por Thung et al. (2018) donde sólo se hace mención a la resistencia contra betalactámicos, macrólidos y glicopéptidos (este último grupo antimicrobiano no se registró la resistencia por parte de las cepas de *S. Agona* en este trabajo). Las nuevas posibles resistencias encontradas en las cepas analizadas de este serovar son para aminoglucósidos, fenicoles, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprimas.

Recopilando los resultados expuestos anteriormente, *Salmonella Agona* es de los serotipos que mayormente se aislaron (cuarto lugar) de alimentos de origen animal entre

el período de 2015 – 2017. Presenta una distribución geográfica dividida en tres corredores (corredor noroeste, corredor noreste-occidente-centro y corredor sureste) los cuales están regidos por la estructura génica entre las cepas de *S. Agona*; además resalta un grupo monofilético marcadamente distinto entre las cepas analizadas de este serovar. Por último, se tiene que cepas de *S. Agona* presentan genes de resistencia a aminoglucósidos, fenicoles, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprimas.

6.4 *Salmonella* Enteritidis

6.4.1 ¿Quién es *Salmonella* Enteritidis?

Formula antigénica de *S. Enteritidis*:

Antígeno O:	1, 9, 12
Antígeno H, fase 1:	g, m
Antígeno H, fase 2:	-

(Grimont, 2008).

Los principales reservorios de *S. Enteritidis* son las aves de corral aunque se encuentra también en frecuencias bajas en ganado. En cuanto a alimentos, las principales fuentes de transmisión son los huevos y la carne de pollo y de otras aves (EFSA, 2017).

La distribución de *S. Enteritidis* es global. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, es el serovar más comúnmente reportado en casos de salmonelosis no tifoidea en Europa, Norteamérica, Sudamérica, África y Asia (Cornell University, 2013).

Haciendo referencia a la diversidad de este serovar, se puede clasificar de acuerdo con su susceptibilidad a los tipos de fagos (tipificación por fagos, PT por sus siglas en inglés), los PT más comunes son PT8 y PT4. La Tipificación molecular con electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) ha mostrado que aproximadamente 40% de los aislamientos caen en el mismo tipo de PFGE. En África subsahariana existen de manera endémica cepas invasoras (que causan bacteriemia) de *S. Enteritidis* (Cornell University, 2013).

Diversos estudios señalan la resistencia a distintos grupos de antimicrobianos por parte de *S. Enteritidis* (Tabla 12).

Tabla 12. Resistencia a distintos grupos de antimicrobianos por parte de *S. Enteritidis* con base a lo reportado por distintos autores.

Grupos de antimicrobianos	Tipo de antimicrobianos
Aminoglucósidos	Estreptomicina ^{1,3} , Gentamicina ¹ , Kanamicina ¹ , Amikacina ¹ .
Betalactámicos	Penicilina ² , Ampicilina ^{1,3} , Amoxicilina-ácido clavulánico ¹ , Cefalotina ¹ .
Sulfonamidas	Trimetoprim-sulfametazol ¹ , Sulfonamida ¹ , Sulfisoxazol ³ .
Macrólidos	Eritromicina ² .
Fenicoles	Cloranfenicol ^{1,3} .
Tetraciclinas	Tetraciclina ^{1,3} .
Quinolonas	Ácido nalidíxico ^{1,3} .
Glicopéptidos	Vancomicina ² .

¹ Busani *et al*, 2004.

² Thung *et al*, 2018.

³ Andino & Hanning, 2015.

Este serovar ha causado numerosos brotes asociados al consumo de huevos contaminados, esto debido a que *S. Enteritidis* se ha adaptado al tracto reproductivo de las gallinas ponedoras (Cornell University, 2013).

En diciembre de 2017 se reportó un brote de *S. Enteritidis* en distintos países de la UE relacionado con el consumo de huevos polacos contaminados con este serotipo, el cual involucró 196 casos confirmados y 72 posibles (EFSA, 2017).

En EUA en 2015 se reportó un brote vinculado a pollos crudos, congelados y rellenos dejando un saldo de cinco personas infectadas en Minnesota de las cuales dos fueron hospitalizadas (CDC, 2015).

En la Tabla 13 se muestra el recuento de algunos brotes registrados de *S. Enteritidis* en distintas partes del mundo.

Tabla 13. Brotes registrados de *S. Enteritidis* por ingesta de alimentos en distintas partes del mundo.

Año	Localidad	Fuente asociada	Número de casos
2017	Varios países europeos	Huevos polacos	196** y 72*
2016	Varios países europeos ¹	Huevos	112** y 148*
2015	EUA - varios estados	Pollos crudos, congelados y rellenos	5
2012	EUA - varios estados	Carne molida	46
2012	EUA - varios estados	Cadena de restaurantes A	68
2011	EUA - varios estados	Nueces de pino turco	43
2011	EUA - varios estados	Coles de alfalfa y coles de Bruselas picantes	25
2011	Inglaterra ²	Huevos	63
2011	Singapur	Mariscos marinados, pasta de mariscos	270
2010	EUA - varios estados	Cáscara de huevo	1,939
2010	Austria ²	Huevos	66

¹Bélgica, Dinamarca, Luxemburgo, los Países Bajos, Noruega, Suecia y el Reino Unido, y posiblemente Croacia.

²No se especifican estados, entidades o regiones donde se presentó el brote.

**Casos confirmados.

* Casos posibles.

(Cornell University, 2013).

6.4.2 *Salmonella* Enteritidis en México.

González et al. (1985) reportan que entre los años de 1974 y 1981 *S. Enteritidis* ocupó el noveno lugar en aislamientos clínicos en México con el 2.4% (68/2,803), mientras que en alimentos, animales y aguas de drenaje no se registró como serotipo perteneciente dentro de los diez más frecuentemente aislados en el país. Por otro lado, Gutiérrez-Cogco et al. (2000) mencionan que en el período comprendido entre 1972 y 1999, *S. Enteritidis* ocupó el segundo lugar en aislamientos clínicos con el 18.3% (2,893/15,843); asimismo los investigadores citan que el número de aislamientos clínicos de este serotipo aumentó a partir de 1991, posiblemente debido al consumo de alimentos contaminados pues también aumentó el número de aislamientos de este serotipo en alimentos.

6.4.3 *Salmonella* Enteritidis en el Mundo.

Reportes de EUA afirman que *S. Enteritidis* ocupa el séptimo lugar de aislamientos en muestras de origen no humano con el 3.8% (181/4,794); cabe destacar que *S. Enteritidis* en muestras clínicas humanas resulta ser el serotipo de *Salmonella* más frecuentemente aislado con el 14.5% (7,111/49,004) (CDC, 2012).

En la UE esta situación persiste a pesar de que, la frecuencia de aislamiento de *S. Enteritidis* ha declinado sustancialmente desde el comienzo de la vigilancia en 2007, debido muy probablemente a las medidas de control implementadas para la regulación en las poblaciones de pollos y las medidas dirigidas al personal operativo de los negocios de alimentos para mejorar la higiene (EFSA, 2017).

6.4.4 Resultados obtenidos para *S. Enteritidis*.

De los 1494 aislados de *Salmonella* analizados, 61 se identificaron como *S. Enteritidis*, formando parte de los diez serotipos mayormente aislados en este proyecto con el 4.1% (Figura 5).

El resultado referente a la distribución geográfica de *S. Enteritidis* en México se muestra en la Figura 17, donde los principales estados que contienen el mayor porcentaje de aislamientos son Sonora, Michoacán y Guanajuato con el 9.8% correspondientemente (Tabla 14).

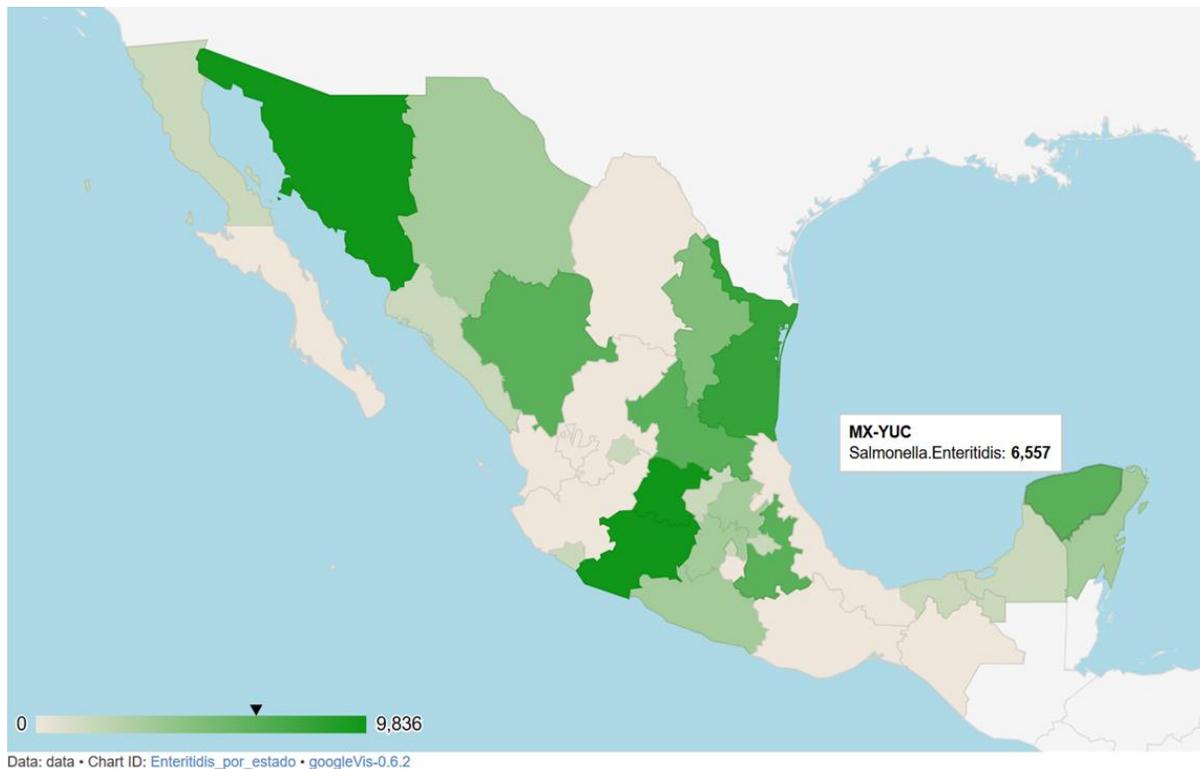


Figura 17. Mapa de distribución geográfica de *S. Enteritidis* a lo largo del territorio nacional.

Tabla 14. Porcentajes de distribución geográfica de *S. Enteritidis*.

Estados	% de Aislados	Estados	% de Aislados
Michoacán	9.8	Quintana Roo	3.3
Sonora	9.8	Hidalgo	3.3
Guanajuato	9.8	San Luis Potosí	1.6
Tamaulipas	8.2	Campeche	1.6
Yucatán	6.6	Colima	1.6
Sinaloa	6.6	Aguascalientes	1.6
Durango	6.6	Querétaro	1.6
Puebla	6.6	Ciudad de México	1.6
Nuevo León	4.9	Tabasco	1.6
Chiapas	3.3	Baja California Norte	1.6
Guerrero	3.3	Tlaxcala	1.6
Jalisco	3.3		

Se observa que *S. Enteritidis* está distribuido a lo largo de la República Mexicana pero al igual que *S. Agona*, muestra tres corredores geográficos, uno en la parte noroeste, otro entre el noreste-occidente-centro y el último en el sureste del país. Este comportamiento apunta a un posible patrón de distribución geográfica a lo largo de la República mexicana por parte de este serotipo para cada uno de los corredores.

Los resultados provenientes de la comparación pareada de *hq*-SNPs entre las cepas de *S. Enteritidis* se muestran en las Figuras 18 (árbol filogenético) y 19 (matriz).

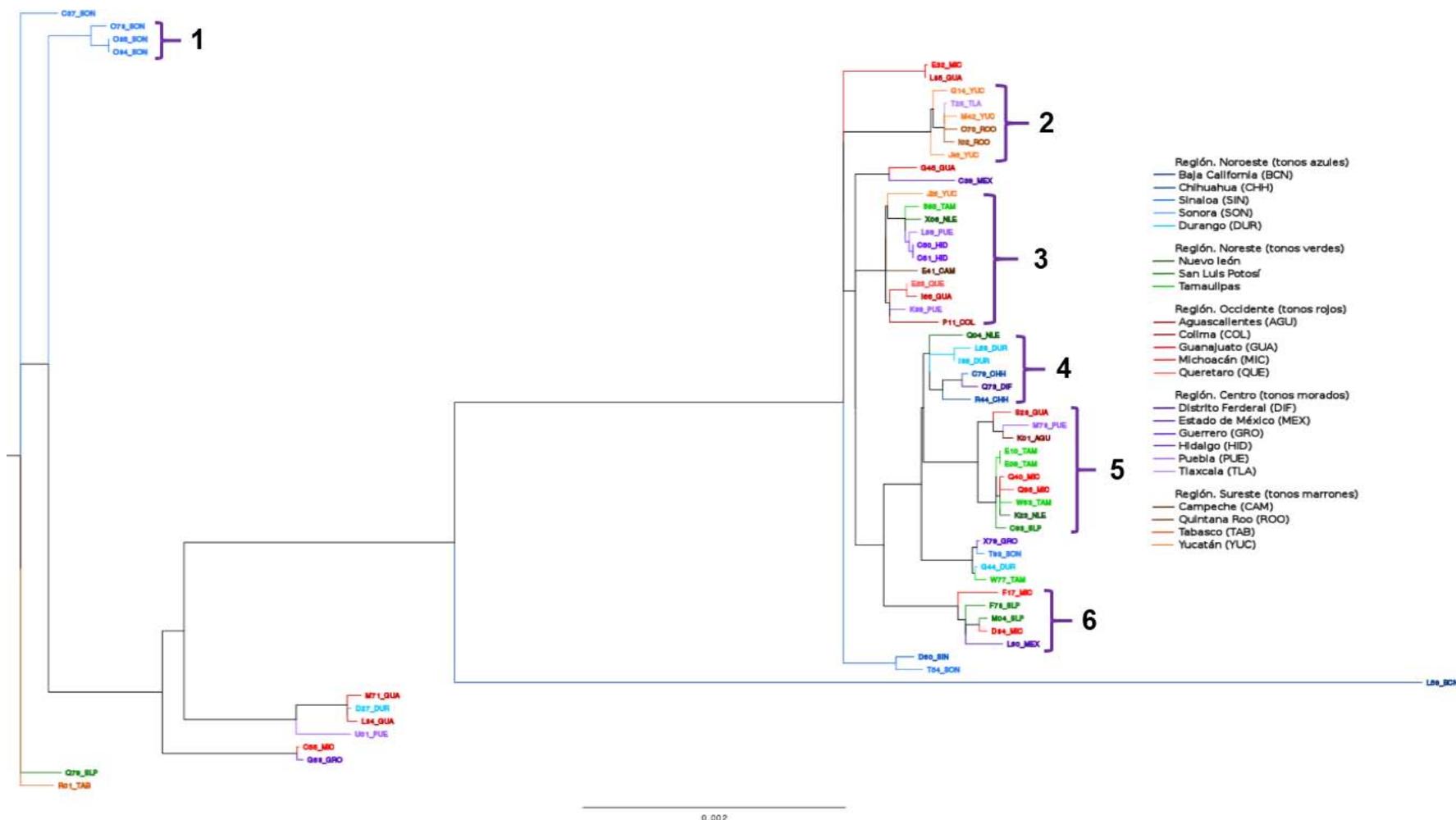


Figura 18. Árbol filogenético de *S. Enteritidis* construido a partir de la comparación pareada de hq-SNPs entre los aislados de este serotipo. La longitud de las líneas del dendograma está dada por la diferencia de SNPs que tienen entre sí los aislados. Los colores están dados por las regiones geográficas (Noroeste, noreste, occidente, centro y sureste) de donde se extrajeron los aislados de *S. Enteritidis*. Se resaltan las agrupaciones con llaves de color morado y se le asigna un número a cada agrupación.

.	C37	C39	C50	C51	C55	C79	C93	D27	D60	D84	E09	E10	E25	E32	E41	F17	F78	G14	G44	G45	G68	I02	I66
C37	-	484	460	462	152	477	474	185	453	488	466	487	378	464	251	509	496	450	346	268	159	474	459
C39	484	-	79	79	455	106	122	469	88	112	111	116	59	95	51	123	116	100	90	39	466	104	79
C50	460	79	-	-	430	83	99	442	66	88	91	96	18	71	23	101	93	76	73	47	442	83	29
C51	462	79	-	-	431	83	100	444	68	88	92	96	18	71	23	101	93	77	73	47	443	82	29
C55	152	455	430	431	-	450	450	161	425	458	440	455	353	433	246	475	467	426	326	250	4	446	434
C79	477	106	83	83	450	-	63	460	92	88	53	57	67	93	61	97	92	101	41	62	457	106	84
C93	474	122	99	100	450	63	-	463	110	102	6	7	83	111	67	115	108	117	57	69	455	123	100
D27	185	469	442	444	161	460	463	-	436	469	449	471	370	450	252	491	479	438	328	255	165	456	446
D60	453	88	66	68	425	92	110	436	-	99	102	106	50	71	43	109	103	76	77	54	438	82	68
D84	488	112	88	88	458	88	102	469	99	-	94	97	72	105	63	35	21	109	75	67	469	113	89
E09	466	111	91	92	440	53	6	449	102	94	-	-	78	106	63	98	93	107	49	67	453	114	93
E10	487	116	96	96	455	57	7	471	106	97	-	-	81	107	67	108	102	112	55	68	465	118	97
E25	378	59	18	18	353	67	83	370	50	72	78	81	-	51	21	83	77	55	62	41	363	59	4
E32	464	95	71	71	433	93	111	450	71	105	106	107	51	-	53	118	109	83	81	56	445	88	72
E41	251	51	23	23	246	61	67	252	43	63	63	67	21	53	-	77	69	50	52	35	253	55	22
F17	509	123	101	101	475	97	115	491	109	35	98	108	83	118	77	-	33	121	82	76	489	128	101
F78	496	116	93	93	467	92	108	479	103	21	93	102	77	109	69	33	-	114	77	73	481	121	94
G14	450	100	76	77	426	101	117	438	76	109	107	112	55	83	50	121	114	-	84	56	434	16	77
G44	346	90	73	73	326	41	57	328	77	75	49	55	62	81	52	82	77	84	-	64	328	84	72
G45	268	39	47	47	250	62	69	255	54	67	67	68	41	56	35	76	73	56	64	-	253	56	48
G68	159	466	442	443	4	457	455	165	438	469	453	465	363	445	253	489	481	434	328	253	-	456	446
I02	474	104	83	82	446	106	123	456	82	113	114	118	59	88	55	128	121	16	84	56	456	-	85
I66	459	79	29	29	434	84	100	446	68	89	93	97	4	72	22	101	94	77	72	48	446	85	-

Figura 19. Fragmento de la matriz de comparación pareada de hg-SNPs de *S. Enteritidis*. En color rojo, se tiene el cotejo de las cepas que muestran menos de un SNP; en color rosa-blanco, se tiene el cotejo de las cepas que muestran entre 2 - 7 SNPs; y en color azul, se tiene el cotejo de las cepas que muestran más de 8 SNPs.

En general, en el árbol filogenético de *S. Enteritidis* (Figura 18) no resaltan grupos monofiléticos marcadamente distintos como se dio el caso en otros serotipos (*S. Typhimurium* y *S. Agona*). Se observa que prácticamente todos los aislados analizados de este serovar se encuentran distribuidos a lo largo del territorio nacional, sin embargo, las diferencias de SNPs entre las cepas pertenecientes a un determinado corredor (Figura 17) son mínimas con respecto a otras cepas que provienen de estados pertenecientes a otro corredor, por ejemplo, las cepas pertenecientes a un mismo corredor tienen una diferencia entre 15 - 35 SNPs, en cambio al comparar cepas de distintos corredores, estas muestran diferencias superiores de 80 SNPs (Figura 19). Es por ello que las cepas que constituyen a las agrupaciones 1 y 4 del árbol filogenético (resaltadas con color morado) coinciden con un corredor (noroeste) e incluso la agrupación 1 muestra indicios de ser cepas clonales tras tener menos de 17 SNPs (Figura 18). Por otra parte, las cepas que componen las agrupaciones 3, 5 y 6 del árbol filogenético corresponden al corredor noreste-occidente-centro del país, otro rasgo característico de estas agrupaciones es que las diferencias de SNPs entre ellas es poca. Por último, las cepas que forman parte de la agrupación 2 del árbol filogenético corresponden al corredor del sureste, siendo un grupo muy marcado donde también se puede pensar en que estas cepas son clonales (menos de 20 SNPs).

Asimismo, la Figura 18 expone que dentro de los aislados de *S. Enteritidis* existen diferencias génicas por lo que se podría realizar una tipificación a nivel de fagos para diferenciarlas.

Los resultados obtenidos con respecto a la identificación de genes que codifican para la resistencia a distintos grupos de antimicrobianos en las cepas analizadas de *S. Enteritidis* se muestran en la Figura 20.

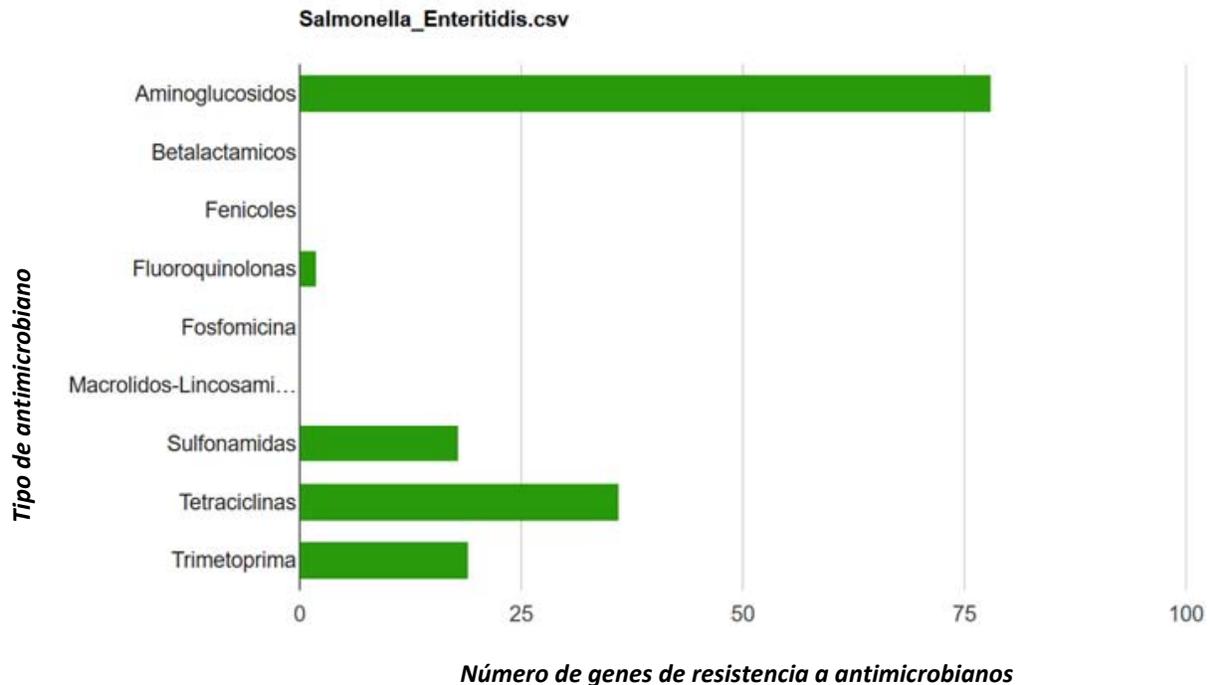


Figura 20. Número de genes de resistencia a ciertos grupos de antimicrobianos para *S. Enteritidis*.

La Figura 20 muestra que al igual que *S. Typhimurium* y *S. Agona*, el mayor número de genes de resistencia que se presenta entre los aislados de *S. Enteritidis* es al grupo de aminoglucósidos (78 genes repartidos entre los 61 aislados de *S. Enteritidis* codifican para la resistencia a este antimicrobiano), seguido por el grupo de las tetraciclinas (36 genes repartidos entre los 61 aislados de *S. Enteritidis* codifican para la resistencia a este antimicrobiano). A comparación con *S. Typhimurium* y *S. Agona*, *S. Enteritidis* presenta un perfil de resistencia a antimicrobianos reducido, ya que dentro de los 61 aislados analizados no se encontraron genes que codifiquen a la resistencia a algún tipo de betalactámico, fenicol, fosfomicina o macrólido-lincosamida-estreptogramina, esto mismo coincide con lo reportado por Andino y Hanning (2015), donde se menciona que a comparación con otros serovares, *S. Enteritidis* tiende a presentar menor resistencia a antimicrobianos.

Los resultados obtenidos difieren en cierto grado con lo reportado en la literatura, por ejemplo, a la resistencia a quinolonas, ya que Busani et al. (2004) reporta la resistencia

de algunas cepas de *S. Enteritidis* al ácido nalidíxico que es una quinolona de primera generación (no fluorada), en cambio en los resultados obtenidos se tiene resistencia a fluoroquinolonas (quinolonas de siguiente generación). Por otra parte, estos mismos autores y en adición con Busani et al. (2004), reportan cepas de *S. Enteritidis* resistentes a betalactámicos, macrólidos, fenicoles y glicopéptidos, lo cual no fue el caso en los resultados obtenidos.

Otra peculiaridad de *S. Enteritidis* es que después realizar un análisis en la base de datos de *Salmonella* con respecto a la matriz alimentaria de la cual provenía cada una de las muestras de este serovar, se tiene que el 77.0 % de los aislamientos se obtuvieron de carne o productos relacionados con pollo, contrario a lo que en años anteriores se reportaba en artículos de esta índole, donde se registraba predominio de serotipos como *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* en fuentes de origen animal principalmente carne de pollo y huevo (Andino y Hanning, 2015; Cornell University, 2013). Actualmente no se reporta ni resultó en este trabajo la incidencia de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* en este tipo de matrices alimentarias, la explicación se puede deber a dos factores; el primero, por la implementación de sistemas de vigilancia y monitoreo para la erradicación de estos serotipos endémicos de aves y sus subproductos a cargo de las organizaciones gubernamentales a quienes les compete la inocuidad alimentaria, y el segundo por el aprovechamiento de *S. Enteritidis* por ocupar el nicho ecológico de estos serotipos de tal manera que ya no permite la proliferación de estos, *S. Enteritidis* tiene la capacidad realizar lo anterior debido a que tiene una fórmula antigénica similar a *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Grimont y Weill, 2008), además que tiene la ventaja sobre estos serotipos por ser una serovariedad móvil, por lo que las aves tienden a ser un hospedero ideal para *S. Enteritidis* (Andino, 2015).

En resumen, *Salmonella* *Enteritidis* en este proyecto es de los serotipos que mayormente se aislaron (sexto lugar) en alimentos de origen animal entre el período comprendido 2015 – 2017; los aislados principalmente provenían de carne o subproductos de pollo. Se encuentra disperso a lo largo del territorio nacional pero muestra una división geográfica en tres corredores (corredor noroeste, corredor noreste-occidente-centro y corredor sureste) los cuales están gobernados por la estructura génica entre las cepas de este

serovar. Se presenta un perfil de resistencia antimicrobiana *in silico* reducido para *S. Enteritidis*, ya que no se encontraron genes de resistencia a algún tipo de betalactámico, fenicol, fosfomicina o macrólido-lincosamida-estreptogramina, pero se identifican cepas con genes de resistencia a fluoroquinolonas (quinolonas de siguiente generación), hecho que no se encontró reportado por otros autores.

7.0 DISCUSIÓN

La información recabada en este proyecto permite dar una aproximación del comportamiento del género *Salmonella* en alimentos de origen animal en nuestro país. Hasta donde fue posible investigar, éste trabajo es el primero en México donde se utilizan los datos derivados de la secuenciación masiva de aislados de distintas serovariedades de *Salmonella* para generar registros de los genes de RAM identificados para cada serovar y las relaciones filogeográficas entre las cepas analizadas de un cierto serotipo. Esto constituye un importante avance a los programas de vigilancia y monitoreo de *Salmonella* establecidos en el SENASICA. Algunas propuestas de mejora, sería realizar un muestreo más homogéneo en todos los estados de la República para disminuir el sesgo de los datos que pudiera existir. Además, implementar un sistema eficiente de trazabilidad de las fuentes alimentarias de donde se extrajeron los aislados de *Salmonella*, para que si en un momento dado surge la necesidad de darse un seguimiento regulatorio, se tenga la información imprescindible para llevarlo a cabo.

En este proyecto se identificaron 75 serotipos distintos en las muestras analizadas, mostrando que los 10 serotipos aislados con mayor frecuencia fueron: **S. Typhimurium, S. Anatum, S. Derby, S. Agona, S. Infantis, S. Enteritidis, S. London, S. Newport, S. Meleagridis, S. Braenderup**. González et al. (1985) reportaron que entre 1974 y 1981 los 10 serotipos mayormente aislados en alimentos fueron **S. Derby, S. Anatum, S. Typhimurium, S. London, S. Agona, S. Infantis**, S. Worthington, S. Give, S. Heidelberg y S. Bovismorbificans; los primeros 6 serotipos mencionados coinciden entre ambos estudios en estar dentro de los 10 serotipos con mayor frecuencia de aislamientos. Por otra parte Gutiérrez et al. (2000) reportaron que durante el período de 1972 a 1999 los 10 serotipos que más se aislaron en alimentos fueron **S. Derby, S. Anatum, S. Agona, S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Infantis**, S. Give, S. Senftenberg, S. Hadar y **S. Newport**; se observa que 7 serotipos de esta lista también se encuentran dentro de los 10 serotipos mayormente aislados en el presente trabajo. Estas comparaciones entre estudios permiten demostrar una persistencia de colonización por parte de estos serotipos en México.

En adición, en este proyecto se identificaron 18 serotipos de *Salmonella* aislados de alimentos que anteriormente no se habían reportado en otros estudios similares a éste en México (González *et al.*, 1985; Gutiérrez *et al.*, 2000), los cuales corresponden a: S. Uganda, S. Albany, S. Kiambu, S. Soerenga, S. Wassenaar, S. Fresno, S. Liverpool, S. Corvallis, S. Falkensee, S. li 48:D:Z6 (Hagenbeck), S. Bareilly, S. Hartford, S. Iv 43:Z4,Z23:- (Houten), S. IV 45:G,Z51:-, S. Krefeld, S. Litchfield, S. Molade, S. Oslo, S. Ouakam y S. Ruiru.

Haciendo referencia a los genes de RAM identificados en los aislados de *Salmonella*, sólo se reconoció una cepa que no presentó ningún gen de RAM, esto posiblemente debido a que dicha cepa o sus antecesores nunca fueron sometidos a una presión evolutiva que comúnmente la ocasiona el frecuente contacto con antibióticos. Prácticamente cualquiera de los aislados analizados es capaz de desarrollar resistencia a por lo menos un tipo de antimicrobiano. La moda surge en los aislados que presentaron un gen de RAM (aprox. el 49.5%), a estos le siguen los aislados que exhibieron dos genes de RAM (aprox. el 8.2%).

Se identificaron 594 cepas (el 39.8% de los aislados) con 3 o más genes de resistencia que codifican para resistencia a 3 o más categorías de antimicrobianos, las cuales pueden ser consideradas como cepas probablemente multi-resistentes; esto de acuerdo con la definición consultada donde se menciona que una cepa multi-resistente en bacterias Gram negativo es cuando expresa resistencia a mínimo tres categorías distintas de antimicrobianos (López *et al.*, 2011).

Es necesario recalcar que la identificación de genes de RAM a nivel secuencia (*in silico*) no refleja si la resistencia se expresa en las condiciones del organismo, por lo que sería necesario realizar experimentos *in vivo* con el aislado para confirmar la expresión fenotípica de la resistencia al antimicrobiano en cuestión; esto mismo se tendría que realizar para la confirmación de cepas multi-resistentes al exponerlas a los grupos de antimicrobianos que resultaron ser posiblemente inhibidos tras la identificación genes que codifican para su resistencia.

Retomando al aislado que presentó 20 genes de RAM, esto indica la gran capacidad que tiene esta bacteria para mutar o incorporar material genético exógeno para defenderse contra agentes que ponen en riesgo su sobrevivencia y que al mismo tiempo representa una ventaja para expandir su nicho ecológico y posibilitar su proliferación (Garza *et al*, 2009).

Este alto número de genes de RAM presentes en ciertos aislados, resalta la importancia de tratar a las infecciones provocadas por *Salmonella* de forma adecuada tanto en animales (principalmente ganado) como en humanos, ya que el mal uso y el abuso de antimicrobianos acelera el proceso de modificación genética en esta bacteria; de lo contrario, si se siguen utilizando los antimicrobianos de forma indiscriminada se ocasionaría un fuerte problema de salud pública ya que se elevaría la dificultad para el tratamiento de las enfermedades derivadas por este patógeno (OMS, 2017).

Se identificaron en total 6275 genes de RAM tomando en cuenta todas las muestras analizadas de *Salmonella* (1494); con base a esto se obtuvo que la mayor parte de estos genes codifican para la resistencia a aminoglucósidos (45.1%) y tetraciclinas (18.3%), lo cual coincide con los análisis de resistencia por clase de antimicrobiano para cada serotipo (perfil de resistencia a antimicrobianos *in silico*), ya que de manera individual la mayoría presentó una alta resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas. Por otra parte, también coincidía en ambos análisis de la baja presencia de genes que codifican para la resistencia a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas (1.6% del total de los genes) y fosfomicinas (0.2%); para esta última clase antimicrobiana, el único serotipo que presentó dicha resistencia fue *S. Infantis*. *S. Enteritidis* presenta un reducido perfil de resistencia a antimicrobianos con respecto a los demás serotipos analizados, lo cual coincide con lo reportado por Andino y Hanning (2015), quienes comentan que este serotipo se caracteriza por tener un perfil de resistencia a antimicrobianos reducido con diferencia a otros serotipos.

Cabe mencionar que se identificaron 102 genes únicos, siendo los betalactámicos la categoría antimicrobiana con mayor diversidad de genes de resistencia (35 genes diferentes); esto daría a la idea que sería el antimicrobiano mayormente inhibido por los productos de estos genes pero como se observó anteriormente, en las cepas de

Salmonella analizadas se identificaron con mayor frecuencia genes de resistencia a aminoglucósidos, lo cual expone que en el presente trabajo que se tiene en las cepas analizadas un mayor número de genes de resistencia que codifican para aminoglucósidos pero se presenta mayor diversidad genética para la resistencia a betalactámicos. No obstante, este trabajo persiste en cuanto a la resistencia antimicrobiana con estudios de distintos autores en México, mencionan que dentro de la mayor resistencia se tienen a aminoglucósidos y betalactámicos (Miranda *et al.*, 2009; Nayarit *et al.*, 2016).

La mayoría de los serotipos analizados se encuentran dispersos a lo largo de la República Mexicana, sin embargo, es posible identificar patrones de distribución o corredores geográficos; en los árboles filogenéticos se observó que cierto número de cepas se agrupaba y éstas coincidían con la región geográfica de la cual se extrajo el aislado, esto sugiere que los patrones o corredores geográficos se rigen por la estructura génica entre las cepas del serotipo en cuestión. Otra variable que podría inferir en la distribución geográfica de un cierto serotipo de *Salmonella* es la competencia por el nicho ecológico que ejercen otras bacterias e incluso serovariedades del mismo género bacteriano, ejemplo de ello es el caso de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, donde *S. Enteritidis* desplazo a estos serotipos de su nicho ecológico (el pollo), trayendo como consecuencia la modificación en su distribución geográfica de *S. Enteritidis* la cual se rige por la ubicación de las granjas donde se crían pollos.

Por otra parte, los árboles filogenéticos y las matrices de comparación pareada de SNPs permitieron identificar la existencia de cepas clonales y el reconocimiento de clados marcadamente distintos dentro de un determinado serotipo como fue el caso de *S. Typhimurium* y *S. Agona*.

Los árboles filogenéticos construidos permitieron el planteamiento de posibles escenarios, como por ejemplo el caso de *S. Typhimurium*, donde posiblemente existan 2 subpoblaciones corriendo por distintas regiones del país, ya que en su árbol se marcan significativamente; para el caso de *S. Agona* es posible que el grupo monofilético sobresaliente de su árbol filogenético, sea una subpoblación de inserción reciente en el territorio nacional. Para dar respuesta a estos posibles escenarios, se necesitaría

comparar con secuencias de cepas antiguamente aisladas o compararlas con secuencias provenientes de distintas partes del mundo.

Para finalizar, es necesario mencionar que este mismo análisis como investigación bibliográfica se realizó para cada uno de los serotipos identificados en la SSB (*S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Enteritidis* y los 72 serotipos restantes) mostrados en la Tabla 5 y que se verán reflejados en el “Atlas de *Salmonella enterica enterica* aislada de alimentos de origen animal en México en el período 2015 – 2017, secuenciación de genoma completo y genes de resistencia a antimicrobianos”.

8.0 CONCLUSIONES

- ❖ De las 1557 muestras secuenciadas de *Salmonella*, se logró la tipificación bioinformática de 1494 cepas, de las cuales se identificaron en total 75 serotipos diferentes.
- ❖ Los serotipos mayormente aislados en este proyecto fueron *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. London*, *S. Newport*, *S. Meleagridis* y *S. Braenderup*.
- ❖ Prácticamente todas las cepas aisladas de *Salmonella* (con excepción de una) presentaron genes de RAM. El número máximo de genes de resistencia identificados fue de 20 (un aislado).
- ❖ De las 1494 cepas analizadas, el 39.8% muestran la posibilidad de ser cepas multi-resistentes.
- ❖ De las 1494 muestras analizadas, se identificaron en total 6275 genes de RAM; la mayor parte codifica para la resistencia a aminoglucósidos y tetraciclinas. Se identificaron 102 genes de RAM únicos.
- ❖ *Salmonella* *Infantis* fue el único serotipo de *Salmonella* que presentó genes de resistencia a fosfomicina.
- ❖ De todas las muestras analizadas, ninguna presentó genes de resistencia a colistina y nitroimidazol.
- ❖ Se sugiere que la distribución geográfica de las cepas de un determinado serovar está regida por su estructura génica.
- ❖ Se encontraron cepas clonales y clados marcadamente distintos en diferentes serotipos analizados de *Salmonella*.
- ❖ Con ayuda de los lenguajes de programación R y Python, se construyeron *scripts* que permitieron una manipulación eficiente de los datos.

9.0 PROSPECTIVAS

- Realizar pruebas fenotípicas y genotípicas para las cepas que no se lograron tipificar pero que mostraron una fórmula antigénica, para discernir de posibles cepas novedosas.
- Realizar pruebas fenotípicas de resistencia a antimicrobianos a las cepas analizadas, principalmente para aquellas con posible multi-resistencia.
- Profundizar en los clados sobresalientes encontrados en ciertos serotipos analizados derivados del análisis filogeográfico.
- Comparar las secuencias nacionales con secuencias internacionales de *Salmonella*, posiblemente en el contexto de la red de GenomeTrakr mediante una colaboración con la FDA.

10.0 APÉNDICES

10.1 APÉNDICE A

```

Read 1  @NS500502_0019_FC_HYJWKBGX:1:11101:15308:1061#ATTACTCG+NCCTCTAT/1
        CCCGANTAAATGCGCATTTGAGCGATTTCCCGGCCCTTTCGGGCAAGGATACGCGTTGCTGCGCACATNGTNNNN
        +
        AAAAA#EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE/EAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE<EEE#E#####
Read 2  @NS500502_0019_FC_HYJWKBGX:1:11101:1157:1063#ATTACTCG+NCCTCTAT/1
        GTCCNGTAGCCGCATGCCGATTGCAACACCCGGGATGGAGGACGAGCAGAGAGCCGCGCCGTAATCCNNNN
        +
        AAAAA#EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE/EA<AAEEEEEAEE/A<E#####
    
```

Identificador del read

Secuencia

Calidad en ASCII

Figura 21. Ejemplo de formato FASTQ. Cada entrada (read) en un archivo FASTQ está constituida por cuatro líneas: 1) identificador (contiene información referente al secuenciador y la corrida de secuenciación), 2) secuencia nucleotídica, 3) signo + (divisor entre la línea de la secuencia y la línea de calidad) y 4) calidad de cada base en escala PHRED.

10.2 APÉNDICE B

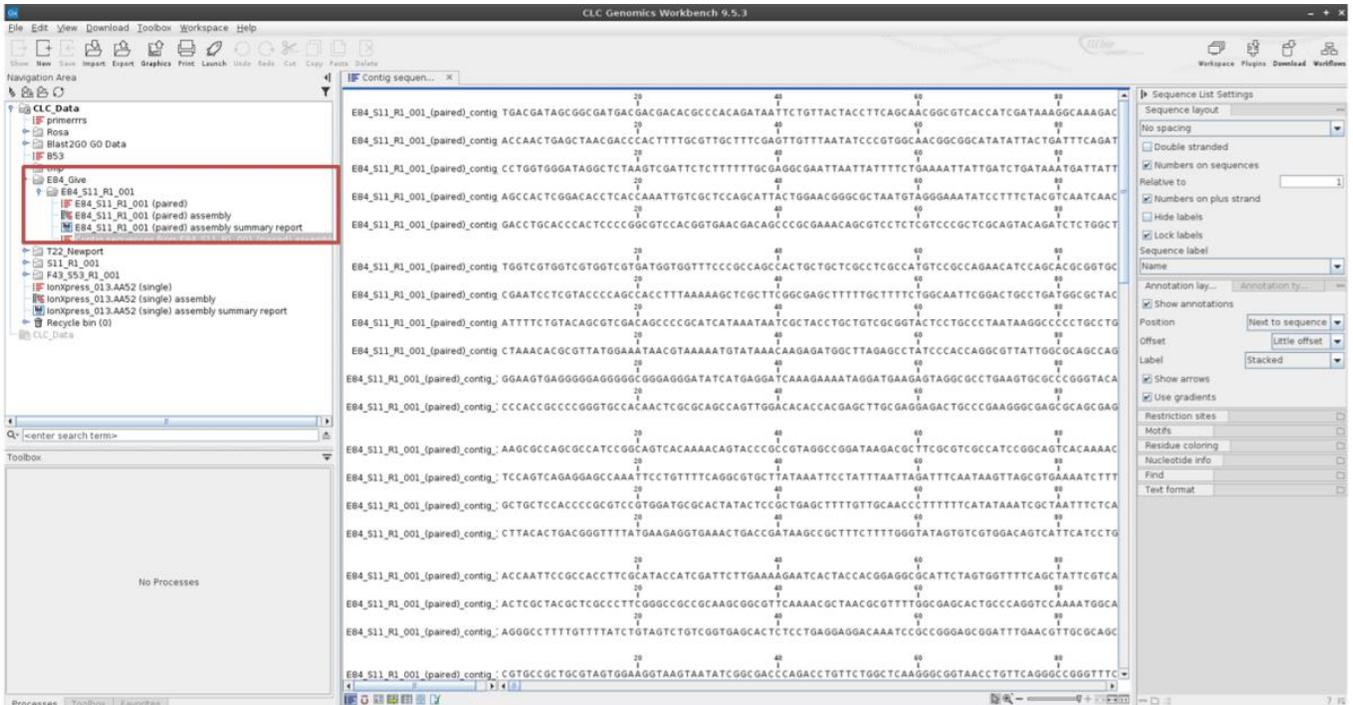


Figura 22. Ejemplo del archivo de salida del software CLC. Ensamble *De Novo* de la secuencia de un aislado de *S. Give* (resaltado de color rojo).

10.3 APÉNDICE C

Sample	ST	aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA	mismatches	uncertainty	depth	maxMAF	Aac6-Iaa_AGly	AadA4-5_AGly	AadA_AGly	TetR_Tet
DfrA7_Tet		FloR_Phe		LnuF_MLS		QnrB_Flq		StrA_AGly		StrB_AGly	SulII_Sul	TEM-10_Bla	TetA_Tet	TetB_Tet	TetC_Tet	
T39	321	119	10	17	42	12	13	4	0	-	26.391	0.181818181818	Aac6-Iy_761*	-	-	-
QnrB10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V38	NF	231	381	245	363	342	216	209	0	-	28.4272857143	0.1	Aac6-Iy_761*	-	-	-
V39	NF	231	381	245	363	342	216	209	0	-	30.2035714286	0.0714285714286	Aac6-Iy_761*	-	-	-
V40	NF	231	381	245	363	342	216	209	0	-	26.9217142857	0.111111111111	Aac6-Iy_761*	-	-	-
V41	NF*	13	109	502*	13	220	13	4	hemD-502/1holes	-	33.5891428571	0.046511627907	Aac6-Iy_761*	-	-	-
V42	34	10	19	12	9	5	9	2	0	-	35.3347142857	0.0571428571429	Aac6-Iaa_760	AadA5_1497	AadA1-om_1597*	-
DfrA17_316		FloR_1212*		LnuF_747		QnrB19_10		StrA_1501*		StrB_1614	SulII_1219*	TEM-33_908*	TetA_1545*?	TetB_1213*		
Tetr_1473																

Figura 23. Ejemplo del archivo de salida del software SRST2. La primer columna corresponde al ID con el que se identifica cada aislado de *Salmonella* secuenciado en la SSB (resaltados de color rojo); las columnas siguientes corresponden a los alelos que permitirán la identificación del serotipo (resaltados con verde) y los nombres de los genes de RAM identificados (resaltados con azul).

10.4 APÉNDICE D

12	S61
13	Antígeno: O-3,10
14	fliC: e,h
15	fljB: 1,6
16	Perfil antigénico: 3,10:e,h:1,6
17	Serotipo: Anatum
18	T78
19	Antígeno: O-3,10
20	fliC: r
21	fljB: z6
22	Perfil antigénico: 3,10:r:z6
23	Serotipo: Weltevreden
24	S92
25	Antígeno: O-4
26	fliC: f,g
27	fljB: -
28	Perfil antigénico: 4:f,g:-
29	Serotipo: Derby

Figura 24. Ejemplo del archivo de salida del software SeqSero. Se presenta el ID con el que se identifica cada aislado de *Salmonella* secuenciado en la SSB (en la imagen se muestran los IDs S61, T78 y S92) así como la información del perfil antigénico que permite la determinación del serotipo correspondiente (en la imagen “Anatum”, “Weltevreden” y “Derby”, respectivamente).

10.5 APÉNDICE E

ID	ST	Genes MLST						
		aroC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
C36	19	10	7	12	9	5	9	2
C37	11	5	2	3	7	6	6	11
C38	152	62	53	54	60	5	53	54
C39	11	5	2	3	7	6	6	11
C40	155	10	60	58	66	6	65	16
C41	19	10	7	12	9	5	9	2
C42	19	10	7	12	9	5	9	2
C43	19	10	7	12	9	5	9	2
C44	754	13	109	49	13	220	13	4
C45	754	13	109	49	13	220	13	4
C46	447	13	127	92	113	114	107	4
C47	40	19	20	3	20	5	22	22
C48	155	10	60	58	66	6	65	16
C49	505	157	142	49	16	40	35	3
C50	11	5	2	3	7	6	6	11
C51	11	5	2	3	7	6	6	11
C52	19	10	7	12	9	5	9	2
C53	19	10	7	12	9	5	9	2
C54	19	10	7	12	9	5	9	2
C55	11	5	2	3	7	6	6	11
C56	22	12	2	15	14	11	14	16
C57	13	3	3	7	4	3	3	7
C58	13	3	3	7	4	3	3	7
C59	152	62	53	54	60	5	53	54
C60	152	62	53	54	60	5	53	54
C61	321	119	10	17	42	12	13	4
C62	50	5	21	18	9	6	12	17
C63	22	12	2	15	14	11	14	16
C64	40	19	20	3	20	5	22	22

Figura 25. Ejemplo del archivo de salida del software ARIBA. La primera columna corresponde al ID con el que se identifica cada aislado de *Salmonella* (color azul); la segunda columna corresponde al tipo de secuencia (ST por sus siglas en inglés) identificada para la cepa analizada (color morado); las siguientes columnas (resaltadas de color rojo) corresponden a los siete genes MLST localizados por el software. Se resalta (color verde) a la cepa que nos permite ejemplificar la búsqueda de serotipo en la base de datos EnteroBase (Figura 26).

10.6 APÉNDICE F

Enterobase *Salmonella* Log In Register Help v1.1.2

Species Home Workspace:None Rows Total:24754 Filtered:24754 Experimental D

Data Source	Source	Collection	Location	Serovar	Subspecies	ST	eBG	Serotype (P...	SarC	dnaN	hemD	hisD	purE	sucA	thrA
MLST(Legacy)	Human		Qatar	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Denmark	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	2003	Portugal	Enteritidis	I (MLST)	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Hedgehog	2000	Germany	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	1997	Zimbabwe	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	1990	France	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Qatar	Enteritidis		11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)			Canada	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Avian	2010	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Reptile	2002	Germany	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Food	2007	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Hedgehog	2002	Germany	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Food	1997	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)				Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)		1995	Belgium	Nitra	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Denmark	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	1999	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Denmark	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Qatar	Enteritidis		11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Reptile	2003	Germany	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		Qatar	Enteritidis		11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)		2006	United States	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	2009	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)		1986	Austria	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Avian		China	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	1985	United States	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Avian	2006	Brazil	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Reptile	2004	Germany	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human		China	Enteritidis	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11
MLST(Legacy)	Human	1997	Switzerland	Rosenberg	I	11	4	Enteritidis	5	2	3	7	6	6	11

Figura 26. Base de datos Enterobase. El perfil alélico de cada aislado (se toma como ejemplo la muestra C50) se introduce a la Enterobase y se obtiene el serotipo correspondiente. En color morado se resalta el serotipo (Enteritidis) y en color rojo se resalta el perfil alélico introducido.

10.7 APÉNDICE G

```

C46,Aac6-Iaa_AGly
C47,Aac6-Iaa_AGly,AadA_AGly,QnrB_Flq,SulI_Sul,TetA_Tet,TetR_Tet
C48,Aac6-Iaa_AGly,QnrB_Flq
C49,Aac6-Iaa_AGly,FloR_Phe,StrB_Agly,SulII_Sul,TetA_Tet,TetR_Tet
C50,Aac6-Iaa_AGly,Aac6-Iaa_AGly
C51,Aac6-Iaa_AGly,Aac6-Iaa_AGly
C52,Aac6-Iaa_AGly,Aac6-Iaa_AGly
C53,Aac6-Iaa_AGly,Aac6-Iaa_AGly,FloR_Phe,TetB_Tet
C54,Aac6-Iaa_AGly,AadA_AGly,TEM-1D_Bla,DfrA1_Tmt,Qnr-S_Flq,Sat-2A_Agly,SulII_Sul,TetA_Tet,TetR_Tet

```

```

C46,Aminoglucosidos
C47,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos,Sulfonamidas,Tetraciclinas,Tetraciclinas
C48,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos
C49,Aminoglucosidos,Fenicoles,Aminoglucosidos,Sulfonamidas,Tetraciclinas,Tetraciclinas
C50,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos
C51,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos
C52,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos
C53,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos,Fenicoles,Tetraciclinas
C54,Aminoglucosidos,Aminoglucosidos,Betalactamicos,Trimetoprima,Aminoglucosidos,Sulfonamidas,Tetraciclinas,Tetraciclinas

```

Figura 27. Matrices de genes de resistencia para cada aislado identificado en la SSB. El recuadro superior muestra un fragmento de la matriz de genes RAM identificados por aislado y el recuadro inferior muestra la matriz de las categorías de antimicrobianos que son inhibidos por los genes identificados de cada aislado.

10.8 APÉNDICE H

```

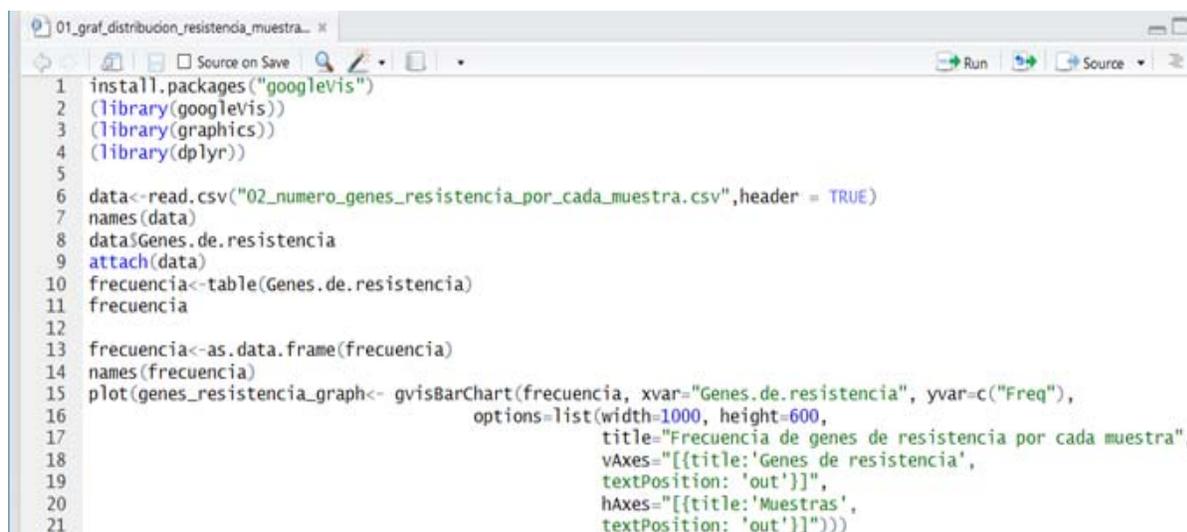
infile=open("01_MGRA_2017_08_30_traducido.txt","r")
outfile=open("02_numero_genes_resistencia_por_cada_muestra.csv","w")

for line in infile:
    #print (len(line))
    try:
        vals=line.split(",")
        ID=vals[0]
        num_genes_resistencia=len(vals)-1
        num_genes_resistencia=str(num_genes_resistencia)
        registro= ID+","+num_genes_resistencia+"\n"
        print(registro)
    except:
        line=line.rstrip()
        registro=line+",0"+"\n"
        print(registro)
    outfile.write(registro)
infile.close()
outfile.close()

```

Figura 28. *Script* de Python empleado para realizar el conteo de los genes de RAM de cada uno de los aislados.

10.9 APÉNDICE I



```

1 install.packages("googleVis")
2 library(googleVis)
3 library(graphics)
4 library(dplyr)
5
6 data<-read.csv("02_numero_genes_resistencia_por_cada_muestra.csv",header = TRUE)
7 names(data)
8 data$Genes.de.resistencia
9 attach(data)
10 frecuencia<-table(Genes.de.resistencia)
11 frecuencia
12
13 frecuencia<-as.data.frame(frecuencia)
14 names(frecuencia)
15 plot(genes_resistencia_graph<- gvisBarChart(frecuencia, xvar="Genes.de.resistencia", yvar=c("Freq"),
16                                             options=list(width=1000, height=600,
17                                                         title="Frecuencia de genes de resistencia por cada muestra",
18                                                         vAxes="[[{title:'Genes de resistencia',
19                                                         textPosition: 'out'}]]",
20                                                         hAxes="[[{title:'Muestras',
21                                                         textPosition: 'out'}]]"))
21

```

Figura 29. *Script* de R para obtener el gráfico de frecuencia de genes de RAM para cada aislado.

10.10 APÉNDICE J

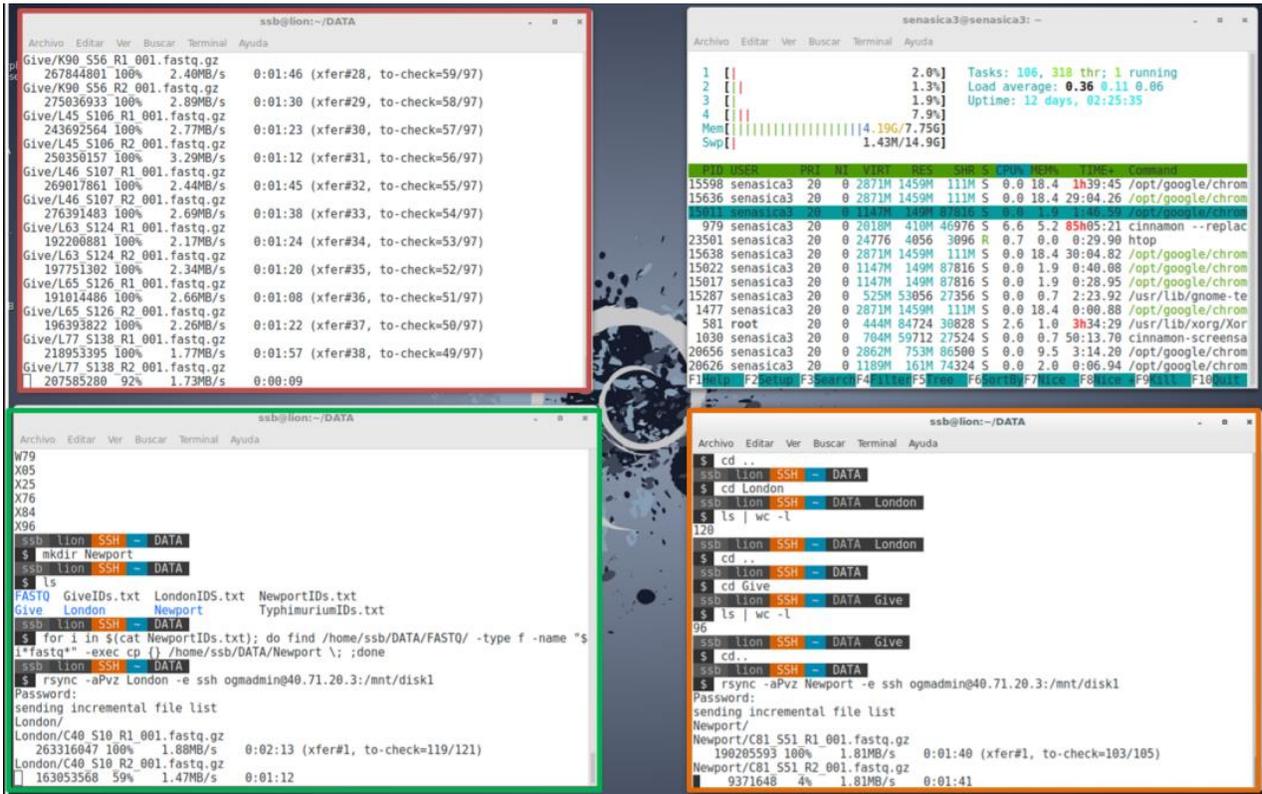


Figura 30. Ejemplo de procesos bioinformáticos en terminal. El recuadro resaltado con rojo muestra el proceso de copiado al servidor de las secuencias de S. Give, el recuadro verde muestra el de S. London y el recuadro naranja el de S. Newport.

11.0 REFERENCIAS

1. Andino, A., & Hanning, I. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*. 2015: 1 – 16.
2. Bhunia, A. & Ray, B. (2010). *Fundamentos de microbiología de los alimentos*. New York: Mc Graw Hill.
3. Bonifield, H. & Hughes, K. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *Journal of Bacteriology*. 2003; 185, 3567 – 3574.
4. Busani, L., Graziani, C., Battisti, A., Franco, A., Ricci, A., Vio, D. & Luzzi, I. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiology and Infection*. 2004; 132(2), 245–251.
5. Calvo, J. & Martínez, L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. Elsevier Doyma. 2009; 27, 44 - 52.
6. CARD (2017). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. [En línea] (16 de abril de 2018). Disponible en: <https://card.mcmaster.ca/home> [Último acceso el 06 de junio de 2018].
7. Carmona, F. (2007). Curso básico de R. [En línea] (15 de febrero de 2007). Disponible en: <http://www.ub.edu/stat/docencia/EADB/Curso%20basico%20de%20R.pdf> [Último acceso el 15 de enero de 2018].
8. Centers for Disease Control and Prevention (2018). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to chicken salad. [En línea] (08 de marzo de 2018). Disponible en: <https://www.cdc.gov/Salmonella/typhimurium-02-18/index.html> [Último acceso: 05 de abril de 2018].
9. Centers for Disease Control and Prevention (2012). National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2012. [En línea] Disponible en: <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/Salmonella-annual-report-2012-508c.pdf> [Último acceso: 07 de marzo de 2018].

10. Centers for Disease Control and Prevention (2015). Outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to raw, frozen, stuffed chicken entrees produced by aspen foods. [En línea] (16 de octubre de 2016). Disponible en: <https://www.cdc.gov/Salmonella/frozen-chicken-entrees-part2-07-15/index.html> [Último acceso: 05 de marzo de 2018].
11. Centers for Disease Control and Prevention (2015). Salmonella Atlas. [En línea] (Actualizado el 09 de marzo de 2015). Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html> [Último acceso: 05 de marzo de 2018].
12. Cornell University (2013). *Salmonella* Serovar Wiki. [En línea] (03 de agosto de 2017). Disponible en: <https://confluence.cornell.edu/display/FOODSAFETY/Salmonella+Serovar+Wiki> [Último acceso: 05 de abril de 2018].
13. Cué, M. & Morejón, M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte II. Otros grupos de antibióticos. Revista cubana de medicina general integral. 1998; 14(4), 362 – 373.
14. Domínguez, O. & Vázquez, E. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation. 2009; 32, 59 - 70.
15. Errecalde, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Buenos Aires: FAO.
16. European Food Safety Authority (2008). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006 - 2007. [En línea] (14 de noviembre de 2008). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2008.206r/epdf> [Último acceso: 07 de marzo de 2018].
17. European Food Safety Authority (2018). Multi-country outbreak of *Salmonella* Agona infections linked to infant formula. [En línea] (15 de enero de 2018). Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/1365e.pdf> [Último acceso: 01 de marzo de 2018].
18. European Food Safety Authority (2017). Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections linked to Polish eggs. [En línea] (11 de diciembre de 2017).

- Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1353/epdf> [Último acceso: 05 de marzo de 2018].
19. European Food Safety Authority (2010). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. [En línea]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2010.1826/epdf> [Último acceso: 05 de marzo de 2018].
 20. European Food Safety Authority (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. [En línea] (10 de marzo de 2016). Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2015.3991/epdf> [Último acceso: 05 de marzo de 2018].
 21. Food and Agriculture Organization (2016). El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016 - 2020. Roma: FAO.
 22. Food and Drug Administration (2017). La FDA investiga múltiples brotes de cepas de *Salmonella* vinculadas a papayas. [En línea] (01 de septiembre de 2017). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm568393.htm> [Último acceso: 28 de mayo de 2018].
 23. Fitzgerald, R., Sherwood, R., Gheesling, L., Brenner, F. & Fields, P. Molecular analysis of the *rfb* O antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(10), 6099 – 6105.
 24. Figueroa, I. & Verdugo, A. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2005; 47, 25 - 42.
 25. Hunt, M., Mather, A., Sánchez-Busó, L., Page, A., Parkhill, J., Keane, J. & Harris, S. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genomics*. 2017; 3(10), 1 - 11.
 26. Garza, U., Silva, J. & Martínez, E. Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*. 2009; 51, 5439 – 5446.

27. González, C., Becerril, P., Mendoza, P. & Bessudo, D. Serotipos de Salmonelas identificados en México entre 1974 y 1981. Boletín de la oficina sanitaria panamericana. 1985; 99(1), 34 - 40.
28. Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E. & Villarreal, J. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. 2014; 30(1), 73-94.
29. Grado, A. & Grado, M (2003). Sistemas de software en bioinformática. [En línea] (01 de febrero de 2003). Disponible en: <http://www.networkworld.es/archive/sistemas-de-software-en-bioinformatica> [Último acceso: 20 de mayo de 2018].
30. Grimont, P. & Weill, F. (2008). Antigenic formulae of the *Salmonella* servovars. Paris: Institut Pasteur.
31. Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P., & González-Andrade, M. D. C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México. 2000; 42(6), 490 - 495.
32. Instituto de biotecnología (2016). Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática. [En línea] Disponible en: <http://www.uusmd.unam.mx/> [Último acceso 30 de mayo de 2018].
33. Jay, J., Loessner, M. & Golden, D. (2005). Modern Food Microbiology. San Marcos: BOARD.
34. Junod, T., López, J. & Gädicke, P. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. Revista médica de Chile. 2013; 141, 298 - 304.
35. Jurado, R., Arenas, C., Doblas, A., Rivero, A. & Torre-Cisnerosa, J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. Medicine. 2010; 10(52), 3497 -3501.
36. Kumar, S., Roshan, B., Diene, S., Lopez, R., Kempf, M., Landraud, L. & Rolain, J. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2014; 58(1), 212 – 220.
37. López, M., Barcenilla, F., Amaya, R. y Garnacho, J. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. Medicina intensiva. 2011; 35(1), 41 – 53.

38. Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2000). Brock Biology of Microorganisms. New Jersey: Prentice-Hall.
39. March, G. Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2017; 35(32), 182 - 188.
40. Miranda, J. M., Mondragón, C., Martínez, B., Guarddon, M., & Rodríguez, J. a. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Salmonella from different raw foods in Mexico. Journal of Food Protection. 2009; 72(5), 966 – 971.
41. Molina, J. (2015). Drogas antibacterianas. [En línea] (Actualizado 16 de mayo de 2015). Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html> [Último acceso 02 de mayo de 2018].
42. Nayarit-Ballesteros, N., Rubio-Lozano, M. S., Delgado-Suárez, E., Méndez-Medina, D., Braña-Varela, D., & Rodas-Suárez, O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. Salud Pública de México. 2016; 58(3), 371 – 377.
43. Olarte J. & Varela G. Epidemiología De La Salmonelosis en México. The World Problem of Salmonellosis. 1964; 13, 445 - 475.
44. OMS (2015). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. [En línea] (Actualizado en septiembre 2017). Disponible en: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/es/> [Último acceso 04 mayo de 2018].
45. OMS (2017). *Salmonella* (no tifoidea). [En línea] (Actualizado en septiembre 2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/> [Último acceso 05 de abril de 2018].
46. OMS (2017). Resistencia a los antimicrobianos. [En línea] (Actualizado en octubre 2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/> [Último acceso 17 de abril de 2018].
47. OMS (2017). Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS.

48. Paredes, F. & Roca, J. Acción de los antibióticos. *Ámbito farmacéutico*. 2004; 23(3), 116 – 124.
49. Rodríguez, B. & Armengol, L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*. 2012; 23(2), 56 - 66.
50. Rogé, A. (2012). Tipificación molecular de *Salmonella* por PCR-RLBH en base a genes codificantes para antígenos flagelares (Tesis de maestría). Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires.
51. Rojas, C. (2016). *Nutrición Microbiana*. Ciudad de México: UAM.
52. Rossum, G. (2009). *El tutorial de Python*. Buenos Aires: Python Software Foundation.
53. Seija, V. & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. [En línea]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf> [Último acceso 07 de marzo de 2018].
54. SENASICA (2015). Secuenciación de Nueva Generación (NGS) para la caracterización y análisis de Organismos Genéticamente Modificados (OGM). [En línea] (Actualizado el 28 de abril de 2015). Disponible en: <https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/Herramientasensenanza-investigacion/Seminarios/Docs/SNG-en-la-caracterizacion-y-analisisde-OGM.pdf> [Último acceso el 18 de Diciembre de 2017].
55. Silverman, M., Zieg, J., Hilmen, M. & Simon, M. Phase variation in *Salmonella*: Genetic analysis of a recombinational switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1979; 76, 391 - 395.
56. The Center for Food Security and Public Health (2013). *Salmonellosis*. Iowa State University.
57. Thung, T., Radu, S., Mahyudin, N., Rukayadi, Y., Zakaria, Z., Mazlan, N., Tan, B., Lee, E., Yeoh, S., Chin, Y., Tan, C., Kuan, C., Basri, D. & Wan-Mohamed-Radzi, C. Prevalence, virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serovars from retail beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 8, 2697.

58. Red de Apoyo a la Investigación (2015). Laboratorio de genómica. [En línea] Disponible en: <http://rai.unam.mx/pages/lgen.html> [Último acceso 06 de junio de 2018].
59. Universidad Nacional Autónoma de México (2015). Salmonelosis. [En línea] (Actualizado el 12 de agosto de 2015). Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/salmonelosis.html> [Último acceso 07 de marzo de 2018].
60. Universidad Nacional Autónoma de México (2014). Método para la determinación de *Salmonella* spp. en alimentos. [En línea]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Pagogenosnorm.Salmonella_17364.pdf [Último acceso 22 de marzo de 2018].
61. U.S. Food & Drugs Administration (2017). La FDA Investiga Múltiples Brotes de Cepas de Salmonella Vinculadas a Papayas. [En línea] (Actualizado el 01 de septiembre de 2017). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm568393.htm> [Último acceso 06 de abril de 2018].
62. Verma, N., Quigley, N. & Reeves, P. O-antigen variation in *Salmonella* spp. *rfb* gene clusters of three strains. *Journal of Bacteriology*. 1988; 170, 103 - 7.
63. Vignoli, R. & Seija, V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. [En línea]. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf> [Último acceso 05 de abril de 2018].
64. WHO (2005). Resistencia antimicrobiana a *Salmonella*. [En línea] (Actualizado el 13 de abril de 2005). Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf [Último acceso 05 de abril de 2018].
65. Xiong, J. (2006). *Essential Bioinformatics*. Cambridge: Cambridge University press.
66. Zaidi, M., López, C. & Calva, E. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006; 48, 121 - 125.