



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**SECUENCIACIÓN COMPLETA DEL GENOMA DE CEPAS DE *SALMONELLA*
ENTERICA OBTENIDAS EN DIFERENTES SEGMENTOS DE LA CADENA
PRODUCTIVA DE BOVINOS CARNE**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

ENRIQUE JESÚS DELGADO SUÁREZ

TUTOR:

**MARÍA SALUD RUBIO LOZANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

COMITÉ TUTOR

**ROCÍO ORTÍZ LOPEZ
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MONTERREY**

**WONDWOSSEN A. GEBREYES
COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE
THE OHIO STATE UNIVERSITY**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi esposa Claudia Oliva... compañera de vida, mi más grande admiradora y mi principal fuente de amor, inspiración y de confianza en mí mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
EL GÉNERO SALMONELLA	8
EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS	11
<i>Salmonellosis tifoidea</i>	12
<i>Salmonellosis no tifoidea</i>	14
<i>La especie bovina como reservorio de Salmonella no tifoidea (SNT)</i>	16
PATOGÉNESIS DE SALMONELLA	18
<i>Mecanismos de adherencia</i>	18
<i>Mecanismos de invasión</i>	20
<i>Mecanismos de supervivencia y multiplicación intracelular</i>	25
<i>Persistencia, infecciones subclínicas y portadores asintomáticos</i>	27
CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE FACTORES DE VIRULENCIA	33
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS	39
ARTÍCULO 1	58
ARTÍCULO 2	92
DISCUSIÓN	117
CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIÓN GLOBAL DEL PROYECTO	125
REFERENCIAS	126
ANEXO. ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS DE DOCTORADO....	139
ARTÍCULO RELACIONADO No. 1. BALLESTEROS ET AL. 2016	140
ARTÍCULO RELACIONADO No. 2. DE LA GARZA GARCÍA ET AL. 2019 (IN PRESS)	158

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, institución a la que tengo el honor de pertenecer. Gracias a sus políticas de superación del personal académico, me fue concedida licencia con goce de salario, para realizar mis estudios de doctorado. Además, recibí recursos financieros adicionales, mediante una beca del Programa de Apoyos para la Superación Académica (PASPA), así como del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), en apoyo a estancias de capacitación en instituciones nacionales e internacionales, así como para asistir a congresos científicos. Asimismo, agradezco la invaluable ayuda recibida por parte de las autoridades y del personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, quienes también contribuyeron a la consecución exitosa de este proyecto. El agradecimiento por el apoyo recibido no se limitará a estas líneas, sino que se materializará en un esfuerzo continuo en pos de la excelencia académica y en la práctica diaria de los valores de la UNAM.

Durante el doctorado se realizaron estancias de capacitación y entrenamiento en técnicas de secuenciación genómica y en análisis bioinformáticos, mismas que fueron clave para el éxito del proyecto y para la conclusión de las actividades con un semestre de anticipación a lo establecido en el programa. En este sentido, debo agradecer el apoyo del personal del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, donde comencé a dar mis primeros pasos en secuenciación genómica. De igual forma, agradezco la asistencia del personal del Center for Food Safety and Applied Nutrition, de la FDA, EEUU, que me capacitaron para que pudiera realizar, por mí mismo, la secuenciación de los aislamientos, así como algunos análisis bioinformáticos preliminares. Además, reconozco el papel clave que tuvo mi estancia en el Laboratorio Nacional de Genética para la Biodiversidad (LANGEBIO), del CINVESTAV-Irapuato, para el aprendizaje de los análisis bioinformáticos necesarios para procesar los datos experimentales. En particular, agradezco el invaluable apoyo del Dr. Francisco Barona Gómez y su equipo de trabajo, que en forma desinteresada y eficiente apoyaron mi desarrollo en

bioinformática. El Dr. Barona, además, contribuyó de manera importante al éxito de las publicaciones, convirtiéndose prácticamente en un tutor más.

En alguna ocasión tuve la oportunidad de escuchar a un experimentado investigador norteamericano decir lo siguiente: *“Es más fácil tener éxito cuando los que están a tu alrededor desean que lo tengas”*. En ese sentido, mi tutora principal, la Dra. María Salud Rubio Lozano, es un ejemplo insuperable. Ella ha sido mi mentora desde la maestría y me ha ayudado a crecer tanto en lo profesional como en lo humano, promoviendo siempre una mejor versión de mí mismo. Para ella, mi más profunda admiración y el compromiso de emularla y de hacer que se sienta satisfecha y feliz por el desempeño y el actuar de sus hijos científicos.

Agradezco también la asesoría de mis otros tutores. La Dra. Rocío Ortiz López me ayudó a dar el primer gran salto de conocimiento en ciencias genómicas, además de fomentar en mí, a través de su exigencia, el trabajar siempre con un alto rigor técnico, necesario para generar un trabajo de alta calidad científica. Por su parte, el Dr. Wondwossen Gebreyes, fue el artífice del proyecto de doctorado. Gracias a su intervención, el proyecto se incluyó en el programa GenomeTrakr de la FDA y se contó con recursos para la secuenciación de las cepas. El Dr. Gebreyes predijo que, terminando el doctorado, tendría un perfil profesional muy competitivo y poco común, que combinaría el conocimiento de las ciencias biológicas con el de la bioinformática. Por ello, le agradezco enormemente que haya creído en mí y que me haya conducido por el camino correcto.

A mi familia, por todo su amor, más que agradecerles, les pido perdón, porque en ocasiones el estrés de los estudios me empujó a enseñarles mi lado oscuro, sin que hubieran hecho nada para merecerlo. Y a pesar de ello, jamás me retiraron su cariño.

A todos los colegas de trabajo y de estudios que siempre me apoyaron, con hechos y/o con palabras, a lo largo del programa.

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis no tifoidea transmitida por alimentos es una de las principales preocupaciones de salud pública a escala global.⁽¹⁾ La carne de diferentes especies, entre ellas la de bovino, es un importante vehículo de transmisión de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, el agente etiológico de esta enfermedad.^(2,3) Sin embargo, se desconocen los mecanismos que permiten a algunas cepas de *Salmonella* colonizar el intestino de varias especies animales sin provocar signos clínicos, convirtiéndolos en reservorios de infecciones humanas. Por tanto, la identificación de los factores que promueven la persistencia del patógeno en animales portadores asintomáticos es de la mayor importancia en términos de salud pública.

Extensas investigaciones genómicas con *S. enterica* ser. Typhimurium han revelado algunos de los genes de virulencia involucrados en la colonización intestinal de varias especies de abasto.⁽⁴⁾ No obstante, estudios de genómica comparativa han documentado que existe variabilidad en el perfil de virulencia entre los serotipos que conforman la subespecie *enterica*.⁽⁵⁾ A pesar de ello, la mayor parte de los estudios en esta área se enfocan en un limitado número de genes de virulencia, así como en la tipificación de aislamientos por electroforesis en gel de campos pulsados.^(6,7) En contraste, los estudios basados en secuenciación genómica completa, que ofrecen información más completa, así como un mayor poder discriminatorio para tipificar los aislamientos, son aun muy escasos. Aun en países desarrollados, los trabajos más completos se limitan al estudio de unos pocos serotipos de relevancia local.^(8,9)

Por otra parte, la emergencia de cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos (MDR) representa un desafío adicional para la salud pública mundial. Lo anterior en virtud de que el tratamiento de infecciones causadas por cepas MDR es mucho más difícil y costoso, lo que incrementa aun más la carga económica asociada con estos padecimientos.⁽¹⁰⁾ Por tanto, la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos (RAM) en cepas de importancia clínica, así como los determinantes genéticos que confieren estos fenotipos, son aspectos clave para contener la diseminación de patógenos MDR.

Aunque numerosos trabajos confirman una frecuencia cada vez más elevada de cepas de *Salmonella* MDR en alimentos de origen animal,⁽¹¹⁻¹³⁾ son pocas las investigaciones que abordan el estudio de susceptibilidad a antibióticos en relación con la identificación de genes de RAM en genomas completos. Esta estrategia puede contribuir a identificar los factores involucrados en la emergencia y la diseminación de la RAM, así como a delinear medidas de control para prevenirlas.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo del presente proyecto es realizar la caracterización genómica de cepas de *S. enterica* asociadas con ganado bovino, en materia de virulencia y de RAM. Lo anterior con el fin de identificar diferencias genéticas que pudieran relacionarse con adaptación a hospederos, patogenicidad general y persistencia. Ello permitirá dimensionar el riesgo que representan estas cepas para la salud pública, así como generar nuevos conocimientos sobre la diversidad genética, la biología, la evolución y la supervivencia de cepas de *Salmonella* asociadas con alimentos.

ANTECEDENTES

EL GÉNERO *SALMONELLA*

Las bacterias que conforman el género *Salmonella* son bacilos GRAM negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, filo *Proteobacteria*. Se comportan como patógenos intracelulares facultativos y entre sus características bioquímicas más importantes figuran su habilidad para producir ácido sulfhídrico, así como su incapacidad para fermentar lactosa y no producir ureasa.^(14,15) Además, son anaerobios facultativos y casi todos los miembros de este género son móviles, gracias a sus flagelos peritricos (Figura 1).



Figura 1. Imagen de una célula de *Salmonella* spp. Creación de Medical Graphics (www.MedicalGraphics.de), autorizada para uso libre bajo licencia CC BY-ND 4.0.

Los organismos de este género son cercanos genéticamente, pues comparten >2,800 de los cerca de 5,000 genes que codifican proteínas en su genoma.⁽⁵⁾ No obstante, poseen características fenotípicas muy diversas (Cuadro 1). Por ello, su taxonomía y nomenclatura fueron motivo de controversia durante décadas. Sin embargo, la aplicación de técnicas moleculares permitió llegar a un consenso, pues se demostró que el género cuenta únicamente con dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*.⁽¹⁶⁾ La primera tiene como hábitat principal el ambiente y los animales de sangre fría, por lo que es de poca relevancia en términos de salud pública. La segunda se subdivide en seis subespecies (Figura 2), la mayoría con el mismo hábitat que *S. bongori*, excepto las subespecies *salamae* y *enterica*, que habitan en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, aunque sin formar parte de la microbiota normal. Entre estas últimas, la subespecie

enterica es la más importante en términos de inocuidad de alimentos y de salud pública, pues a ésta corresponde el 99.5% de las cepas aisladas.⁽¹⁷⁾ Además, se llegó al acuerdo de designar los serotipos de la especie *S. bongori* y de todas las subespecies de *S. enterica* por su fórmula antigénica (ej. *S. bongori* 13,22:z39:-), excepto en la subespecie *enterica*, donde se mantienen los nombres debido a la familiaridad en su uso y por ser la más relevante en salud pública. Así, como solamente se usan nombres en una subespecie, no es necesario que ésta se indique. Por ejemplo, es correcto escribir *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium o simplemente *S. enterica* ser. Typhimurium.⁽¹⁷⁾

Cuadro 1. Características bioquímicas diferenciales en las especies y subespecies de *Salmonella*

Características bioquímicas	Subespecies de <i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>díarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinasa	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
L(+)-tartrato	+	-	-	-	-	-	-
β-glucorinadasa	d	d	-	+	-	d	-
Lactosa	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-

d = resultados diferentes según el serotipo.

+ = 90% o más de reacciones positivas.

- = 90% o más de reacciones negativas.

Fuente: Adaptado de Grimont y Weill.⁽¹⁷⁾

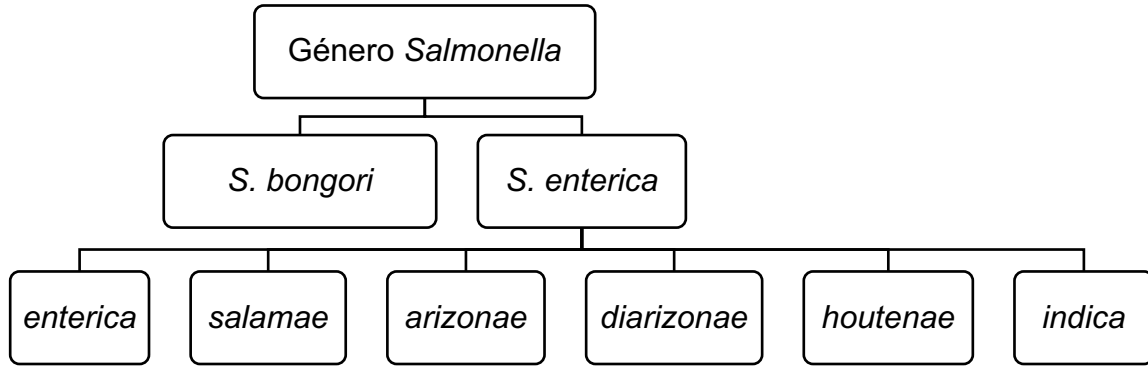


Figura 2. Taxonomía del género *Salmonella*, que comprende dos especies y seis subespecies.⁽¹⁷⁾

Se han descrito más de 2,600 serotipos de *Salmonella*, la mayoría de los cuales (>1,500) pertenecen a la subespecie *enterica*,⁽⁵⁾ que como se indicó anteriormente, es la más relevante en salud pública. La tipificación de los aislamientos se basa en los antígenos superficiales somáticos (O) y flagelares (H). El antígeno O es determinado por la cadena variable de lipopolisacáridos que se encuentran en la membrana externa; mientras que el H es determinado por las estructuras flagelares que expresa la bacteria (Figura 3). Existe un tercer determinante antigénico relacionado con la cápsula (K), pero este solo está presente en cepas de *S. enterica* ser. Typhi y se le denomina como Vi, por ser un reconocido factor de virulencia que le permite al patógeno evadir la respuesta inmune del organismo humano.⁽¹⁸⁾

Desde su descubrimiento en 1885 por Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith,⁽¹⁹⁾ a quien debe su nombre, *Salmonella* está entre los microorganismos más estudiados.⁽²⁰⁾ Sin duda, ello obedece a la relevancia epidemiológica de este patógeno, que al parecer causaba estragos desde hace varios siglos. Estudios genómicos recientes lograron identificar material genético de *S. enterica* ser. Paratyphi C en víctimas de una epidemia que devastó la población del México prehispánico entre 1545 y 1550.⁽²¹⁾

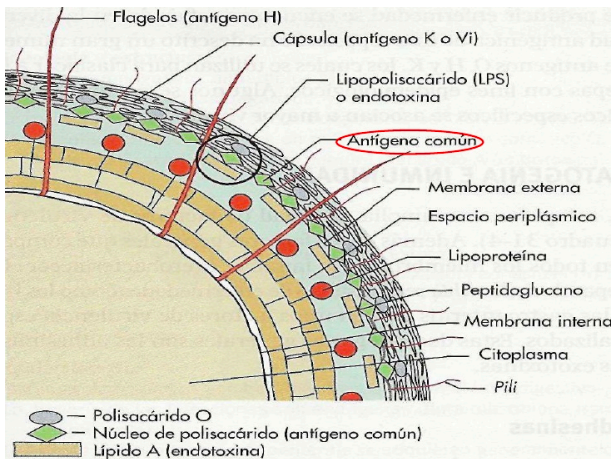


Figura 3. Estructuras determinantes de los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y de cápsula (K o Vi) en enterobacterias. Imagen de Gómez-López (<https://es.slideshare.net/lagl89/enterobacteriaceae>).

EPIDEMIOLOGÍA DE LA SALMONELOSIS

A pesar de la considerable diversidad de serotipos, solo unos pocos (menos de 100) provocan infecciones en humanos.⁽¹⁴⁾ En general, las cepas de importancia clínica pueden dividirse en tifoideas (restringidas a los humanos) y no tifoideas (capaces de infectar humanos y animales). Aunque ambos grupos son muy cercanos genéticamente, manifiestan fenotipos muy distintos. Tanto las cepas tifoideas, como unas pocas no tifoideas altamente adaptadas a ciertas especies animales, se caracterizan por su alta virulencia, causando fiebre entérica, un síndrome asociado con infecciones sistémicas graves en los hospederos afectados. En contraste, la mayoría de las cepas no tifoideas son generalistas (o promiscuas) y suelen presentarse como infecciones asintomáticas o causar gastroenteritis autolimitante en individuos inmunocompetentes de humanos, aves y mamíferos (Figura 4).^(22,23) Además, son capaces de penetrar los tejidos de frutas y hortalizas (ej. tomate, germinados, papaya, mango, espinacas), alimentos que en los últimos años se han asociado de manera creciente con brotes de salmonelosis no tifoidea.^(24,25)

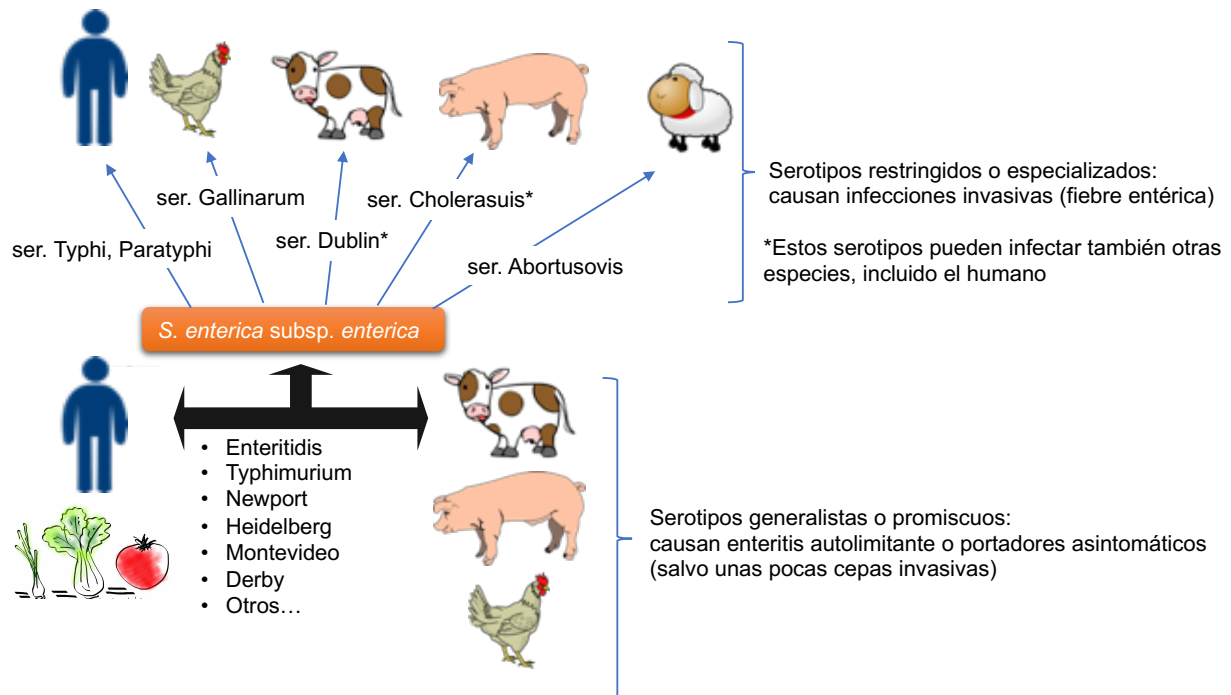


Figura 4. Rango de hospederos de serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* generalistas y especializados y síndrome clínico que provocan en las especies afectadas.

Salmonelosis tifoidea

La fiebre tifoidea (causada por *S. enterica* ser. Typhi) y paratifoidea (causada por *S. enterica* ser. Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C y Sendai) son enfermedades invasivas, con riesgo para la vida, que producen prácticamente la misma sintomatología clínica.⁽²³⁾ Al llegar a los intestinos, *Salmonella* Typhi se adhiere a las células epiteliales especializadas “M” que cubren las placas de Peyer. Después de penetrar la mucosa intestinal, es absorbida por macrófagos, mismos que utiliza para diseminarse por todo el organismo a través del sistema linfático, llegando a multiplicarse en células mononucleares de hígado, bazo y médula ósea. Aunque esta bacteremia inicial es asintomática, después de 7-14 días de incubación se comienzan a observar los síntomas. Un rasgo distintivo de las primeras etapas de la enfermedad es la fiebre persistente, que se torna permanente a medida que avanza la septicemia, lo que se acompaña de dolores de cabeza, letargo, malestar general, mialgia y dolor abdominal. Hacia la segunda semana, las afectaciones al hígado provocan hepatoesplenomegalia y comienzan a aparecer manchas rosas en la piel, típicas de la infección; mientras que el

dolor de cabeza es reemplazado por el estupor. A partir de la tercera a cuarta semana, las hemorragias y las perforaciones intestinales son comunes, mientras que la fiebre comienza a ceder. No obstante, en esta fase el curso de la enfermedad suele complicarse con episodios de miocarditis, choque, meningitis y/o neumonía, lo que resulta a menudo en la muerte del paciente.⁽¹⁴⁾ Aun los que alcanzan a sobrevivir, pueden presentar recaídas frecuentes o convertirse en portadores crónicos, debido a que la bacteria forma biopelículas en las piedras presentes en la vesícula biliar.⁽²⁶⁾

Se estima que las cepas tifoideas causan alrededor de 27 millones de casos de fiebre entérica y 600 mil muertes cada año.⁽²⁷⁾ Al ser cepas restringidas al humano, su principal mecanismo de transmisión es la contaminación fecal de bebidas y alimentos por personas enfermas, convalecientes o portadoras. Las zonas con hacinamiento y/o pobres condiciones sanitarias facilitan la diseminación del patógeno por la vía fecal-oral.⁽²⁸⁾ Por ello, las incidencias más elevadas se presentan en el sudeste asiático y en África, con 394 y 724 casos por cada 100 mil habitantes, respectivamente.⁽²⁹⁾ En México, según datos oficiales, se reportaron 57,738 casos de salmonelosis tifoidea en 2017 (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>). Considerando la población total de ese año (129'678,021 habitantes), se obtiene una incidencia nacional de 44.5 casos por cada 100 mil habitantes. Ello evidencia las deficiencias que persisten, en algunas zonas del país, en materia de acceso a agua potable y servicios sanitarios. En los países con acceso universal al agua potable y con una infraestructura sanitaria de calidad, la incidencia de la enfermedad es muy baja (0.1 casos por cada 100 mil habitantes)⁽²⁹⁾ y la mayoría de los casos se relacionan con visitas de personas no vacunadas a países en donde la fiebre tifoidea es endémica.

La situación es muy distinta en el caso de la salmonelosis no tifoidea, la cual se presenta a escala global y es la principal causa de hospitalizaciones y de muertes asociadas con el consumo de alimentos en países ricos y pobres.^(1,30,31)

Salmonelosis no tifoidea

La salmonelosis no tifoidea es por lo general una enfermedad autolimitante. En personas saludables, la gran mayoría de estas cepas no se extiende más allá de la lámina propia y de los linfonodos locales del intestino. Después de un período de incubación de 6-72 h (24 h en promedio), se presentan los típicos síntomas de dolor abdominal, diarrea profusa con o sin presencia de sangre, así como fiebre de 38.5-39.0 °C.^(14,23) Por lo general, la enfermedad cede en aproximadamente una semana, sin necesidad de tratamiento.⁽³²⁾ Sin embargo, algunas cepas no tifoideas suelen causar infecciones sistémicas, con altas tasas de mortalidad, en personas inmunodeprimidas (pacientes con malaria o VIH) o malnutridas.⁽³³⁾ Además, los serotipos altamente adaptados a especies animales (ej. *S. enterica* ser. Dublin y Cholerasuis), aunque rara vez se presentan en humanos, suelen causar bacteremia, sin provocar daños considerables a nivel intestinal.⁽¹⁴⁾

Entre las cepas no tifoideas, los serotipos Enteritidis y Typhimurium son los que con mayor frecuencia se asocian con infecciones alimentarias a escala global. Ambos serotipos, en conjunto, llegan a causar entre 40 y 60% de los brotes en Estados Unidos⁽³⁴⁾ y en la Unión Europea,⁽³¹⁾ respectivamente. No obstante, según estas mismas fuentes, un porcentaje considerable de las infecciones son causadas por una variedad de serotipos (ej. Heidelberg, Newport, Montevideo, Infantis, Stanley, Derby Kentucky, entre otros), cuya distribución relativa suele seguir un patrón errático, difícil de atribuir a causas específicas. Por ejemplo, en los últimos años se ha observado una reducción en la incidencia del serotipo Enteritidis en la Unión Europea, a expensas de un aumento en la del serotipo Derby.⁽³⁵⁾

La situación en cepas asociadas con alimentos es muy similar. En diferentes estudios realizados en México a lo largo de 40 años se puede observar como algunos serotipos, luego de presentarse en las frecuencias más altas, no fueron detectados en años posteriores. Por el contrario, cepas que antes no eran detectadas, se presentaron en altas frecuencias (Cuadro 2).

Aunque se puede argumentar que la comparación entre estudios no es consistente, esta misma tendencia se ha presentado en muestreos longitudinales. Tal es el caso de lo

encontrado por Habing et al.⁽³⁶⁾ en granjas lecheras de Estados Unidos entre los años 2000 y 2009. Estos autores observaron como el serotipo Typhimurium, que era el más prevalente en una de las granjas en 2000, no fue detectado en 2009. Por el contrario, el serotipo Montevideo, que apenas representó un 4% de los aislamientos obtenidos en 2000 en la misma granja, fue el único serotipo detectado nueve años después.

Cuadro 2. Serotipos de *Salmonella enterica* aislados de muestras de origen no clínico en México entre 1972 y 2013

Período	n	Serotipos predominantes (%)	Referencia
1972-1999	8551	<ol style="list-style-type: none"> 1. Derby (13.8) 2. Anatum (8.7) 3. Agona (7.5) 4. Typhimurium (6.8) 5. Enteritidis (6.7) 	(37)
2002-2005	767	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anatum (17.7) 2. Meleagridis (13.0) 3. Agona (7.3) 4. Typhimurium (6.8) 5. Newport (2.6) 	(38)
2013	171	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kentucky (32.2) 2. Anatum (29.9) 3. Reading (17.2) 4. Meleagridis (12.6%) 5. Cerro (4.6%) 	(39)

Evidentemente, la serotipificación por sí sola, si bien permite identificar cepas de alta virulencia, especialistas o generalistas, no alcanza a explicar los cambios en la distribución relativa o predominancia de ciertos serotipos. Tampoco permite dimensionar el riesgo para la salud pública asociado con la presencia de muchas de estas cepas en muestras de alimentos, algo que hasta la fecha ha sido abordado de forma muy limitada por la comunidad científica.

La especie bovina como reservorio de *Salmonella* no tifoidea (SNT)

Entre los alimentos de origen animal, el pollo y el huevo son los más frecuentemente implicados en brotes de salmonelosis.^(23,24) No obstante, los bovinos también constituyen un importante reservorio de SNT, pues investigadores de prácticamente todas las latitudes han aislado al patógeno de heces, linfonodos, canales y carne de esta especie.^(11,40-43)

En México, la frecuencia de contaminación con SNT en muestras de origen bovino reportada en estudios recientes es muy superior a la observada en otras naciones (Cuadro 3). Aunque ninguna de las investigaciones referidas en el Cuadro 3 se relaciona con cepas de origen clínico, los datos ilustran de forma clara la importancia de los bovinos como reservorio de SNT en nuestro país. Las altas frecuencias de contaminación de cortes y de carne molida en puntos de venta, con valores iguales o superiores a los reportados en carne de pollo,^(38,44,45) evidencian la exitosa diseminación del patógeno en la cadena productiva de bovinos de carne. En adición a lo anterior, es importante considerar que la carne de res está entre las de mayor consumo *per capita* en México.⁽⁴⁶⁾ Este hecho, aunado a que el sistema de vigilancia epidemiológica que existe en el país no reporta los alimentos implicados en los brotes de salmonelosis, resalta la importancia de estudiar las poblaciones de SNT asociadas con la especie bovina.

La investigación en este campo es vital, ya que los factores que determinan la colonización de una determinada especie permiten entender la epidemiología de la salmonelosis. Un caso que ilustra lo anterior es el serotipo Enteritidis, que presenta un factor, codificado por el gen *yafD*, que le confiere resistencia a los inhibidores presentes en la albúmina del huevo.⁽⁴⁷⁾ Esto explica el predominio de Enteritidis sobre otros serotipos de *Salmonella* en huevo para plato.⁽⁴⁸⁾ De igual forma, ofrece información valiosa para diseñar nuevas investigaciones encaminadas a prevenir que el patógeno utilice al huevo como reservorio y de ahí se disemine por la cadena productiva, con el riesgo que ello implica para la salud pública. Por tanto, resulta estratégico investigar los factores de patogenicidad que utiliza *Salmonella* en diferentes especies.

Cuadro 3. Frecuencia de muestras positivas (%) a *Salmonella* spp. en diferentes matrices de origen bovino reportadas en varios países

País	Año	n	% positivos	Referencia
<i>Heces</i>				
México	2013	68	94.1	(39)
México	2013	250	46.8-91.0	(49)
Estados Unidos	2016	5,050	9.1	(50)
Etiopía	2016	1,203	2.3	(51)
Venezuela	2013	80	13.8	(52)
<i>Linfonodos</i>				
México	2013	68	57.8	(39)
Estados Unidos	2012	906	0.8	(53)
Estados Unidos	2017	5,450	7.1	(54)
<i>Canales</i>				
México	2007	32	28.1	(55)
México	2012	505	15.4	(56)
México	2013	250	6.0-49.0	(49)
Estados Unidos	2013	42,368	1.0	(57)
Canadá	2011	1,036	0.1	(58)
Irlanda	2014	400	0.3	(59)
<i>Carne molida</i>				
México	2008	1,733	15.9-60.5	(38)
México	2013	238	43.2-68.5	(60)
México	2016	100	16.0	(61)
Tailandia	2018	240	7.5	(7)
China	2016	210	4.8	(41)
Irlanda	2014	100	3.0	(59)
Estados Unidos	2012	60	1.0	(40)

PATOGÉNESIS DE SALMONELLA

Para que se presente un caso de salmonelosis transmitida por alimentos, es preciso ingerir alimentos o agua contaminados con *Salmonella*. Posteriormente, el patógeno debe sortear numerosos obstáculos para producir la infección. El primero de ellos es la acidez estomacal. Para resistir el pH extremadamente bajo del estómago, la bacteria utiliza un mecanismo de homeostasia inducible, conocido como respuesta de tolerancia a la acidez (ATR, por sus siglas inglesas). La ATR favorece la supervivencia de *Salmonella* durante la exposición a valores de pH que normalmente resultan letales (2.5-3.0).^(62,63) Para ello, el patógeno expresa genes que codifican proteínas de choque ácido, tales como el factor sigma RpoS y el sistema regulador de dos componentes PhoP/PhoQ. Se ha demostrado que RpoS y PhoPQ protegen a *Salmonella* de los ácidos inorgánicos, mientras que RpoS, la proteína reguladora del hierro Fur y la proteína de respuesta adaptativa Ada son responsables de la tolerancia a la acidez provocada por ácidos orgánicos.⁽³⁴⁾

Una vez que el patógeno llega al intestino, se deben producir una serie de pasos o etapas para que se manifieste la enfermedad. Un pre-requisito para la infección es que las células de *Salmonella* expresen flagelos y quimiotaxis, necesarios para acercarse a las células del epitelio intestinal, las cuales necesita contactar.⁽⁶⁴⁾ Una vez allí, la primera fase conlleva la adhesión de la bacteria a las células epiteliales, desde donde activa los mecanismos de invasión, que es la segunda etapa. Después de ser internalizada, se inicia la fase de supervivencia intracelular, en la cual el patógeno debe ser capaz de traspasar y/o evadir los mecanismos de defensa del hospedero, para finalmente producir daños y signos clínicos. A continuación, se analizarán los mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* en su interacción con diferentes hospederos, así como los determinantes genéticos involucrados.

Mecanismos de adherencia

La colonización de un hospedero por bacterias patógenas depende, en primer término, de su habilidad para adherirse a las células eucariotas. Para este fin, la generalidad de los patógenos utiliza moléculas llamadas adhesinas, que son proteínas capaces de reconocer y combinarse con receptores específicos presentes en las células del

hospedero. Esta especificidad de unión determina el rango de especies que puede ser colonizada por una bacteria, así como la afinidad de la misma por determinados órganos y/o tejidos (organotropismo).⁽⁶⁵⁾

Las adhesinas bacterianas se pueden clasificar en dos grandes grupos: fimbriales y afimbriales. Las fimbrias son apéndices proteínicos, más delgados y cortos que un flagelo, compuestas por subunidades estructurales (o de soporte) y adhesivas (las que se adhieren a las glicoproteínas de las células eucariotas, pues poseen una alta afinidad por los azúcares). Por su parte, las adhesinas afimbriales, en lugar de estar contenidas en las fimbrias, se ubican en la membrana externa y tienen como función unirse en forma estrecha a la célula hospedera o al material extracelular presente.⁽⁶⁶⁾

Salmonella posee un vasto repertorio de adhesinas, tanto fimbriales como afimbriales, que le permiten unirse a las células del epitelio intestinal y, en algunos casos, facilitar la internalización de la bacteria (Cuadro 4). Mientras que las adhesinas afimbriales suelen estar presentes en la mayoría de las cepas no tifoideas, las fimbrias codificadas en plásmidos y las polares largas no están uniformemente distribuidas en los diferentes serotipos,⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾ un fenómeno que se asocia con la adaptación a distintos hospederos. Además, resulta relevante señalar que las fimbrias codificadas en plásmidos son más comunes en cepas portadoras del plásmido de virulencia de *Salmonella* (spv), tales como *S. enterica* ser. Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis y Dublin,^(67,68) que manifiestan fenotipos de alta invasividad.

Como se puede observar, *Salmonella* posee un gran número de genes que codifican para adhesinas, lo que evidencia que los patógenos disponen de múltiples mecanismos de adhesión.⁽⁷¹⁾ Esta redundancia pudiera estar asociada con el hecho de que la simple adherencia pudiera facilitar la fagocitosis y la eliminación de la bacteria por las células del sistema inmune. De ahí que la biogénesis de ninguna de las adhesinas utilizadas por las bacterias se exprese de manera constitutiva, sino ante señalizaciones físico-químicas, tales como temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes.⁽⁷²⁾ Ello limita el uso de las adhesinas como moléculas diana para el desarrollo de nuevos antibióticos y/o de vacunas.⁽⁶⁶⁾

Cuadro 4. Adhesinas fimbriales y afimbriales descritas en *Salmonella* spp., genes que las codifican y función que cumplen⁽⁷³⁾

Adhesina	Función
Fimbrias	
Delgadas agregativas (<i>csgABCEFG</i>)	Adhesión a las vellosidades intestinales y unión entre varias células de <i>Salmonella</i>
Polares largas (<i>lpfABDCE</i>)	Adhesión a las placas de Peyer (modelo murino)
Codificadas en plásmidos (<i>pefABCD</i>)	Unión a las microvellosidades de los enterocitos
Tipo 1 (<i>fimACDFHIWYZ</i>)	Internalización independiente del sistema de secreción tipo 3 en células dendríticas (modelo murino)
Adhesinas afimbriales	
Adhesina de matriz extracelular (<i>misL</i>)	Se adhiere a matriz extracelular y facilita la colonización intestinal
Adhesinas-isla de patogenicidad CS54 (<i>ratB, shdA, sinH</i>)	Colonización intestinal y persistencia

Mecanismos de invasión

Salmonella se encuentra entre los patógenos más versátiles en lo que a mecanismos de invasión se refiere. Por lo general, el tejido linfoide asociado con el intestino constituye la principal vía de entrada, sobre todo las células M, que a diferencia de los enterocitos, carecen de microvilli y no están recubiertas de glicocalix, lo que las hace más vulnerables a la invasión por organismos patógenos.⁽⁷⁴⁾

El mecanismo de invasión clásico es el conocido como disparo o trigger, el cual es mediado por el sistema de secreción tipo 3 (T3SS), codificado por más de 40 genes presentes en la isla de patogenicidad (SPI) 1 de *Salmonella*. El T3SS es una estructura supramolecular, compuesta por múltiples proteínas, que se asemeja a una jeringuilla y es utilizada para introducir proteínas efectoras en las células eucariotas (Figura 5).

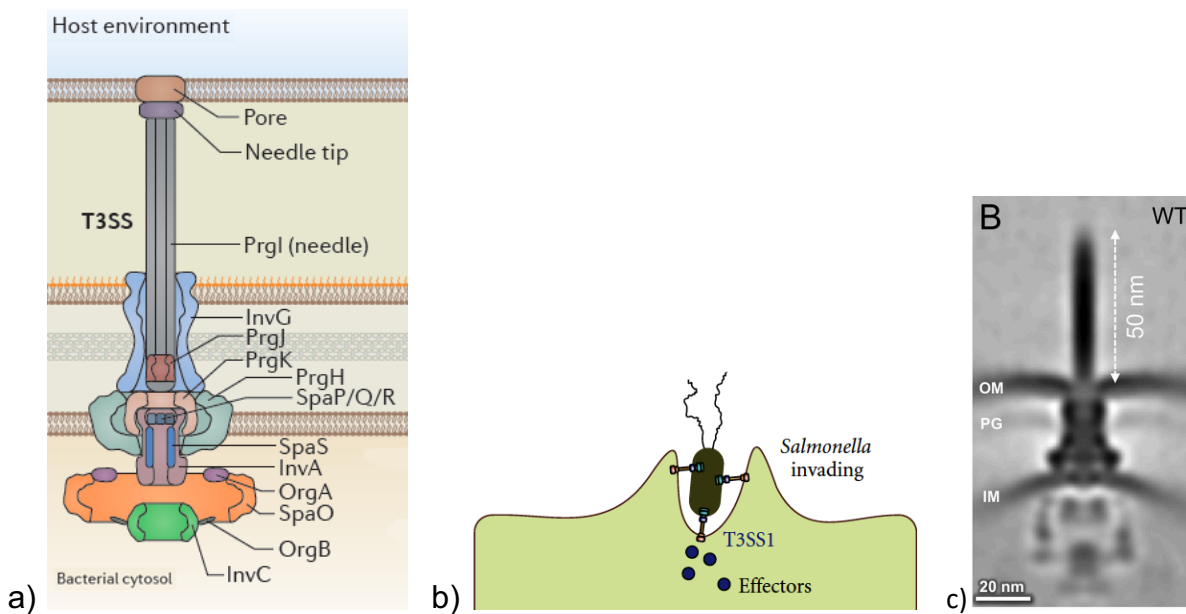


Figura 5. T3SS codificado en la SPI1 de *S. enterica*: a) representación esquemática del inyectisoma⁽⁷²⁾, b) translocación de proteínas efectoras a células eucariotas vía T3SS⁽⁷⁵⁾ y c) tomograma que muestra el despliegue *in situ* del inyectisoma de *S. enterica* ser. Typhimurium en un cultivo celular.⁽⁷⁶⁾

Los genes codificados en la SPI1 comprenden varios operones (*prg*, *org*, *inv* y *spa*), necesarios para la conformación estructural del T3SS; mientras que los operones *sic/sip* codifican proteínas efectoras y el translocon (SipBCD), una estructura que forma un poro en la membrana celular de la célula hospedera a través del cual se translocan las proteínas efectoras.

La SPI1 codifica también otras proteínas, conocidas como chaperonas, las cuales se unen a otras proteínas (secretadas o efectoras) y previenen su degradación o interacción prematura con sus moléculas diana; o bien, son necesarias para que las proteínas a

transportar hacia la célula hospedera, a través del inyectisoma, sean reconocidas por el T3SS.⁽⁷⁷⁾ Además, varias proteínas efectoras translocadas a través de T3SS-SPI1 están codificadas fuera de la SPI1 (ej. SopB, codificada en SPI5).

Varias proteínas efectoras (SipA, SopE, SopE2, SopB) translocadas por el T3SS-SPI1 a las células epiteliales, que normalmente no son fagocíticas, inducen rearrreglos del citoesqueleto de actina de la célula hospedera, lo que da lugar al ondulamiento o ruffling en su superficie, lo que permite la internalización de la bacteria (Figura 6).

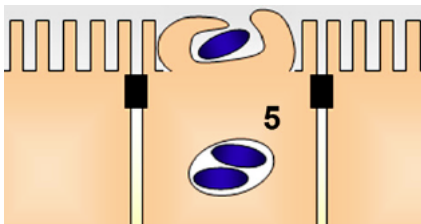


Figura 6. Representación esquemática de la invasión de células del epitelio intestinal por *S. enterica* ser. Typhimurium.⁽⁷⁷⁾

La actividad de estas proteínas efectoras, algunas de las cuales (ej. SopE) funcionan como factores de intercambio de guanidina (GEF), activan las enzimas Rho GTPasas Cdc42 y Rac-1 de la célula hospedera, mismas que estimulan la expresión del factor NF- κ B, lo que induce la producción de citocinas proinflamatorias, tales como IL-8, generando inflamación en la mucosa intestinal.⁽⁷⁷⁾ El proceso inflamatorio atrae un gran número de neutrófilos, algunos de los cuales migran a través del epitelio hasta el lumen intestinal. Aunque el influjo de neutrófilos ayuda a contener la infección en el intestino, produce daño tisular y afecta la barrera de permeabilidad del epitelio. Como resultado, el exudado de los tejidos pasa al lumen intestinal, contribuyendo a la diarrea mediada por un mecanismo de inflamación.⁽⁷⁸⁾

La pequeña proporción de células de *Salmonella* que logra penetrar el tejido intestinal es eventualmente eliminada por el sistema inmune. Por tanto, la invasión y la supervivencia intracelular en un cuadro de gastroenteritis representa un callejón sin salida para el patógeno.⁽⁷⁹⁾ Sin embargo, la reacción inflamatoria provoca cambios importantes en el lumen intestinal, que permiten a *Salmonella* multiplicarse a mayor velocidad, convirtiéndose en el organismo predominante de la microbiota presente.^(80,81) Los

mecanismos usados por la bacteria para superar a la microbiota intestinal en el intestino inflamado serán tratados más adelante, en la sección de multiplicación y supervivencia intracelular.

Otro mecanismo de invasión que puede emplear *Salmonella* es el mediado por los sistemas de secreción tipo IV (T4SS), una estructura supramolecular semejante al T3SS, usualmente codificada en plásmidos.⁽⁸²⁾ Aunque el proceso de internalización en células eucariotas mediado por T4SS no ha sido descrito en *Salmonella*, se supone que sigue un proceso de fagocitosis inducida similar al descrito para el T3SS. Además, estudios recientes demuestran que cepas portadoras de T4SS tienen una tasa de invasión más alta en comparación con las cepas que sólo portan T3SS.⁽⁸³⁾

Una alternativa adicional a T3SS y T4SS, es el mecanismo de invasión tipo cierre o “zipper”, el cual fue observado por primera vez en *Salmonella*. En esta variante, descrita en *S. enterica* ser. Enteritidis,⁽⁸⁴⁾ la proteína de membrana externa RcK cumple la doble función de adherirse e invadir las células. Esta proteína induce la formación de filamentos de actina, que rodean a la bacteria y permiten que la misma se internalice a través de una especie de cierre, de ahí el nombre dado a este mecanismo (Figura 7). Además, se ha demostrado que las fimbrias tipo 1 representan un mecanismo de invasión adicional, mediante el cual *Salmonella* es absorbida por las células dendríticas de la submucosa.⁽⁸⁵⁾

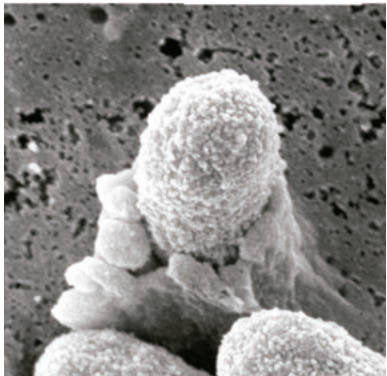


Figura 7. Imagen de microscopio electrónico que muestra la internalización por mecanismo tipo zipper en cepas de *Escherichia coli* transformadas para portar la proteína de membrana externa RcK de *Salmonella*.⁽⁸⁴⁾

Otro factor a tomar en cuenta es la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión de los genes necesarios para la invasión, los cuales a menudo requieren de interacción con otros clusters de genes ubicados en diferentes partes del cromosoma. El regulador central de los genes de la SPI1 es HilA, una proteína que pertenece a la familia de activadores transcripcionales OmpR/ToxR. La expresión de *hilA* está reprimida de forma constitutiva por una proteína de tipo H-NS, que se une al ADN y evita que la ARN-polimerasa pueda iniciar su transcripción. No obstante, a bajas concentraciones de oxígeno, alta osmolaridad (300 mM) y pH ligeramente alcalino, condiciones típicas del lumen intestinal, la proteína HilD (regulador central de los genes de virulencia), se une con H-NS, lo que activa la transcripción de HilA y, con ello, la expresión de los genes de SPI1, que da inicio a la patogénesis.^(74,77)

Algunos autores han observado variaciones en el contenido de genes de SPI1, así como variabilidad en las secuencias de genes que codifican para varias proteínas efectoras que son translocadas por T3SS-SPI1. En un estudio con cepas de varios serotipos de SNT aislada de gallinas ponedoras, se observó que las variaciones en SPI1 eran más frecuentes en las cepas que mostraron un fenotipo de virulencia más bajo (serotipos Adelaide y Bredeney), las cuales no provocaron infección en modelo murino. Sin embargo, aun las cepas con modificaciones en SPI1 se detectaron en las heces de los ratones hasta por 21 días.⁽⁸⁶⁾

En otro estudio con cepas de los serotipos Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar y Kentucky, aisladas de pollos de engorda, Dhanani et al.⁽⁸⁷⁾ observaron también diferencias en cuanto a contenido de genes en SPI1. Sin embargo, la mayoría de las cepas presentó un alto grado de conservación en los genes de virulencia involucrados en la invasión.

Al igual que en los mecanismos de adherencia, la redundancia metabólica en los mecanismos de invasión representa un desafío enorme para el desarrollo de intervenciones encaminadas a prevenir la salmonelosis en humanos y en animales. De hecho, se ha demostrado que la disrupción de varios genes de la SPI1 no ha tenido efecto negativo en la colonización de pollos, cerdos y bovinos por cepas de *S. enterica* ser. Typhimurium.⁽⁴⁾ Estos hallazgos son congruentes con la ausencia de genes como

hilA, así como de varios operones completos (*inv*, *spa*, *hil*) que codifican el T3SS-SPI1 y proteínas reguladoras en cepas aisladas de diferentes especies animales.^(7,88) La habilidad de estas cepas para colonizar los animales sin depender de la SPI1 demuestra el robusto y diversificado metabolismo de *Salmonella*, el cual limita las posibilidades de atacar el proceso infeccioso con nuevos antibióticos.⁽⁸⁹⁾

Mecanismos de supervivencia y multiplicación intracelular

Las modificaciones provocadas por la invasión, en el citoesqueleto de las células epiteliales, desmantela el borde en cepillo característico del epitelio y genera ondulaciones que rodean la bacteria hasta formar unas vesículas llamadas “vacuolas contenedoras de *Salmonella*” (SCV). Las SCV protegen al patógeno de los agentes antimicrobianos producidos por el hospedero y es el único compartimento intracelular donde éste puede sobrevivir y multiplicarse.⁽⁷⁷⁾ Al atravesar el epitelio intestinal, la bacteria es también fagocitada, principalmente por los macrófagos que se acumulan en las placas de Peyer y en los linfonodos mesentéricos, como respuesta a la infección. En estas células, la bacteria es también internalizada en una SCV.⁽⁹⁰⁾

En la fase intracelular, la supervivencia de *Salmonella* depende, en primer término, de los factores de virulencia que conforman un segundo T3SS, codificado en la SPI2. Esta isla tiene dos segmentos. El más pequeño contiene el operon *ttrRSBCA*, necesario para la reducción del tetrionato, lo que le confiere a *Salmonella* una ventaja clave que le permite crecer a mayor velocidad que el resto de la microbiota intestinal y convertirse en un componente mayoritario de la misma.⁽⁸¹⁾

El crecimiento fermentativo de la microbiota en el ambiente anaerobio del intestino produce acumulación de sulfuro de hidrógeno (H_2S), un compuesto altamente tóxico. Para protegerse de éste, los enterocitos producen la enzima sulfuro oxidasa, que oxida el H_2S en tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$); mientras que las especies de oxígeno reactivo (ROS) producidas por los neutrófilos durante el proceso inflamatorio, convierten el tiosulfato en tetrionato ($S_4O_6^{2-}$).⁽⁹¹⁾ Como *Salmonella Typhimurium* puede usar el tetrionato como un aceptor terminal de electrones, esto le permite a la bacteria obtener energía para el crecimiento en el intestino inflamado, una característica que no está presente en la mayor parte de la biota concomitante.

Esta colonización del lumen intestinal es un factor importante para la transmisión fecal oral del patógeno hacia otros hospederos susceptibles. Por ello, es reconocido como la fuerza selectiva principal que actúa sobre las poblaciones de *Salmonella* asociadas con reservorios animales.⁽⁷⁸⁾ Además, enfatiza la importante contribución del repertorio genético de *Salmonella* para su adaptación a hospederos, lo que determina sus características como patógeno transmitido por los alimentos.

Por lo general, las SCV se integran a la ruta endocítica y son expuestas a los lisosomas, donde son finalmente destruidas, lo que hace que remita la infección y que se reconstituya la zona apical del borde en cepillo del epitelio intestinal.⁽⁷⁷⁾ Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, la bacteria logra mantener la integridad de la SCV, con ayuda de otras proteínas efectoras secretadas a través del T3SS-SPI2 y utiliza los macrófagos para diseminarse de forma sistémica.⁽⁹⁰⁾ Por lo general, la bacteremia sólo se presenta en unos pocos serotipos de *Salmonella* (Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis y Dublin), que usualmente portan factores de virulencia adicionales, en el llamado plásmido de virulencia (o pSLT, en *Salmonella* Typhimurium). Este plásmido posee una zona altamente conservada de 8 kb, que contiene cinco genes, conocida como la región *spvRABCD*.⁽⁶⁷⁾

El gen *spvR* codifica una proteína reguladora, de la familia LysR, que actúa a nivel transcripcional para activar los genes presentes en el operón *spvABCD*. Esto ocurre en la fase estacionaria de crecimiento del patógeno; o bien, en el ambiente intracelular de las células hospederas.⁽⁷⁷⁾ Se ha observado que los genes *spvB* y *spvC* codifican proteínas efectoras necesarias para que se manifieste la bacteremia y son translocadas al citosol eucariota vía el T3SS-SPI2. SpvB es una ADP-ribosiltransferasa que modifica la G-actina, previniendo su polimerización en F-actina. Esto daña el citoesqueleto de actina, dificultando el reclutamiento de la NADPH oxidasa hacia el fagosoma y, en consecuencia, la muerte de *Salmonella* por oxidación. Por otra parte, se piensa que la actividad inhibitoria de SpvC sobre las MAP-quinasas, contribuye a inducir la apoptosis de los macrófagos, en concierto con SpvB. La apoptosis de los macrófagos hace que éstos sean fagocitados por otros macrófagos no infectados, lo que representa un mecanismo de diseminación mediante el traspaso directo de una célula a otra.⁽⁶⁷⁾ Ello explica la

ineficacia del tratamiento con antibióticos que actúan a nivel extracelular en casos de salmonelosis no tifoidea invasiva. Este ciclo de infección sistémica sólo se detiene mediante la inducción de células inmunes específicas T CD4+,⁽⁹²⁾ un modelo congruente con la observación de bacteremia recurrente en pacientes con VIH que poseen bajos niveles de células T CD4+.⁽⁹³⁾

Persistencia, infecciones subclínicas y portadores asintomáticos

Como se mencionó anteriormente, *Salmonella* es también capaz de establecer infecciones subclínicas o asintomáticas en varias especies animales, incluso en los humanos.^(43,94-96) Esta es la razón de que el patógeno sea aislado con frecuencia de muestras de origen no clínico asociadas con producción animal. Este fenómeno tiene fuertes implicaciones en la epidemiología de la salmonelosis transmitida por alimentos, especialmente cuando la bacteria es capaz de establecer reservorios en animales que están destinados a la producción de carne.

Estudios recientes demuestran que el estrés fisiológico asociado con el transporte y con el manejo *ante mortem* favorece la multiplicación de *Salmonella* en macrófagos, así como su excreción en las heces.^(97,98) Al respecto, la Figura 8 muestra cómo la exposición *in vitro* de macrófagos alveolares porcinos, infectados con *Salmonella* Typhimurium, a concentraciones crecientes de cortisol, evidenció que el estrés intensifica la multiplicación intracelular del patógeno.

Dado que prácticamente todos los animales sufren algún grado de estrés en la etapa *pre mortem*, se ha sugerido que la producción intensiva podría generar condiciones que favorezcan un ciclo permanente de transmisión fecal oral.⁽⁸⁸⁾ Es probable que esta dinámica de transmisión funcione como un factor determinante en la representación relativa de ciertos serotipos de *Salmonella* no tifoidea en diferentes especies animales y zonas geográficas.

En un estudio reciente, se observó que la emergencia de *S. enterica* ser. Cerro, en ganado bovino de Estados Unidos, se asociaba con la capacidad de estas cepas para causar infecciones subclínicas. Sin embargo, el análisis genómico de estas cepas no evidenció alguna diferencia sustancial en los genes de virulencia, que pudiera

relacionarse con fenotipos menos virulentos. Estos autores especulan que, al no existir infecciones aparentes, no se tomaban medidas para contener la diseminación del patógeno, lo que facilitó su predominancia en la población de *Salmonella* circulante.⁽⁹⁹⁾

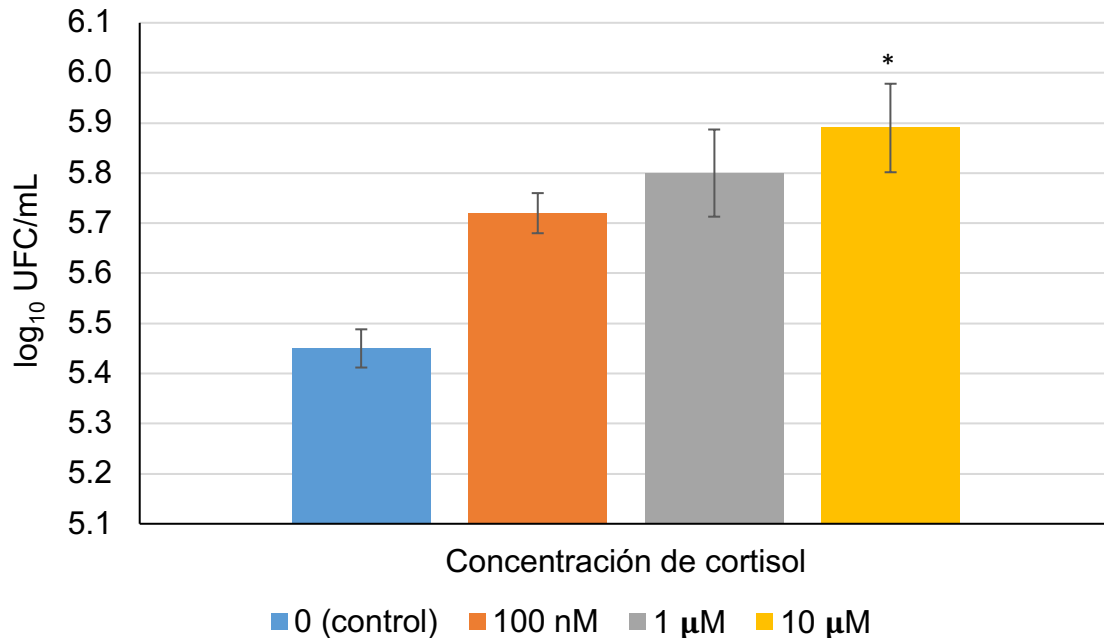


Figura 8. Concentración intracelular de *Salmonella* Typhimurium (log₁₀ UFC/mL ± desviación estándar) en cultivo de macrófagos alveolares porcinos expuestos a concentraciones crecientes de cortisol. * = diferencia significativa con respecto al control (P<0.05). Adaptado de Verbrugghe et al.⁽⁹⁸⁾

Resultados semejantes se obtuvieron en análisis de genómica comparativa con cepas de *S. enterica* ser. Sofia, un serotipo predominante en la industria avícola de Australia que rara vez causa infecciones en aves y en humanos.⁽⁷⁰⁾ A diferencia de *Salmonella* Typhimurium LT2, el genoma de los aislamientos del serotipo Sofia carecía de los genes *sugR* y *rhuM*, de la SPI3; *avrA*, de la SPI1, así como *sopB* y *pipBC*, de la SPI5. Además, se observaron modificaciones en las secuencias nucleotídicas de otros genes de la SPI1 (*orgB*, *prgl*, *sptP*, *sipD*, *invJ*). No obstante, muchos de estos cambios se han observado previamente en otras cepas de *S. enterica*, sin que los mismos se asocien con fenotipos menos virulentos.⁽¹⁰⁰⁾

Esta falta de correlación entre el contenido de genes de las cepas y el fenotipo de virulencia ha hecho que los investigadores traten de explicar este fenómeno desde la perspectiva de la expresión génica. En este sentido, se ha observado que los genes requeridos para causar salmonelosis aguda, parecen no ser expresados por la bacteria en un contexto de infección subclínica persistente.⁽¹⁰¹⁾ Esto podría explicar el porqué los animales no muestran signos clínicos, a pesar de ser portadores del patógeno. Esta hipótesis es también congruente con el hecho de que las cepas con perfil de virulencia aparentemente más bajo, suelen ser excretadas a más altas concentraciones en las heces, lo que favorece su diseminación.⁽⁸⁶⁾

En general, los mecanismos moleculares involucrados en el establecimiento de infecciones subclínicas o portadores asintomáticos son poco conocidos. La mayor parte de los estudios genómicos en este campo se han realizado en *Salmonella* Typhi, por ser éste uno de los serotipos que con mayor frecuencia se relaciona con las dos entidades clínicas antes mencionadas.^(96,102,103) Al respecto, se ha descrito que la colonización y la formación de biopelículas en la vesícula biliar, es un factor clave que permite a *Salmonella* Typhi establecer infecciones crónicas en humanos. Sin embargo, aún se desconocen los genes involucrados en este proceso.⁽¹⁰²⁾ Los pocos estudios realizados con la persistencia de cepas no tifoideas tampoco han aportado resultados concluyentes.^(104,105) No obstante, la creciente disponibilidad de la secuenciación completa de genomas ha comenzado a generar información relevante en esta área.

Uno de los hallazgos más intrigantes ha sido el descubrimiento de genes, que se creían exclusivos de *Salmonella* Typhi, en un limitado número de cepas no tifoideas. De particular importancia es el caso de los que codifican para la llamada “toxina tifoidea”, la cual tiene un papel central en la patogénesis de la fiebre entérica.^(106,107)

La toxina tifoidea está codificada en una isla genómica de alrededor de 5 kb (denominada como SPI11 en *Salmonella* Typhi y como isla CDT en otras cepas) que contiene homólogos de dos exotoxinas bacterianas distintas: la toxina distensora citoletal (CDT) y la toxina pertussis.⁽¹⁰⁸⁾ Ambas toxinas son del tipo AB, lo que indica que están compuestas por una subunidad activa (A), que ejerce el efecto tóxico y varias

subunidades de “entrega” (B), que se unen a receptores específicos de la célula hospedera para facilitar el ingreso de la toxina.⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾

La CDT es una genotoxina cuya unidad activa (CdtB) es una deoxirribonucleasa que fragmenta el cromosoma de las células hospederas, lo que detiene el ciclo celular y, eventualmente, conlleva a la muerte por apoptosis.⁽¹¹²⁾ Sin embargo, el genoma de cepas tifoideas y no tifoideas sólo contiene homólogos de las subunidades activas de ambas toxinas (*cdtB* y *pltA*, de CDT y pertussis, respectivamente) y sólo un homólogo de las subunidades de entrega de la toxina pertusis (*pltB*).

Probablemente, la carencia de genes que codifiquen para las subunidades de entrega sea la causa de que la toxina tifoidea sólo muestre el fenotipo tóxico cuando *Salmonella Typhi* se ha internalizado en las células eucariotas, dentro de la SCV. Estudios proteómicos han demostrado que la toxina tifoidea es de tipo A₂B₅, lo que implica que cinco moléculas de PltB (subunidad de entrega) se unen con una molécula de PltA y otra de CdtB.⁽¹¹³⁾

PltB muestra una alta especificidad para unirse a las unidades de glicano presentes en la superficie de células epiteliales y leucocitos, sobre todo aquellos que terminan en ácido siálico, llamados por tanto sialoglicanos.⁽¹¹³⁾ Los sialoglicanos producidos por las células humanas poseen una terminación de ácido N-acetilneurámico (Neu5Ac). En otros mamíferos, el Neu5Ac es modificado por una hidroxilasa (ausente en humanos), que lo convierte en ácido N-glicolilneurámico (Neu5Gc).⁽¹⁰⁷⁾ De hecho, este hallazgo es el que ha ayudado a descifrar el porqué las cepas tifoideas están restringidas al hospedero humano. Estudios en modelos animales demostraron que PltB se une de preferencia a sialoglicanos terminados en Neu5Ac. Además, se ha comprobado que cultivos de células humanas a los que se adiciona Neu5Gc, el cual es incorporado en su metabolismo y termina formando parte de los sialoglicanos superficiales, son prácticamente inmunes a la actividad citotóxica de la toxina tifoidea.⁽¹¹⁴⁾

Dilucidar la función de los genes codificantes de la toxina tifoidea, los cuales tienen un alto grado de conservación en las cepas no tifoideas,⁽¹¹³⁾ podría tener repercusiones clínicas y epidemiológicas de gran relevancia para la fiebre entérica. Aunque es un área

de intensa investigación, los estudios realizados en este campo aun no arrojan resultados concluyentes.

Experimentos *in vitro* han demostrado el fenotipo citotóxico de cepas no tifoideas portadoras de la isla CDT en cultivos celulares humanos (Figura 9). Por ello, se ha sugerido que esta toxina podría tener un papel similar en la patogénesis de cepas no tifoideas.^(115,116)

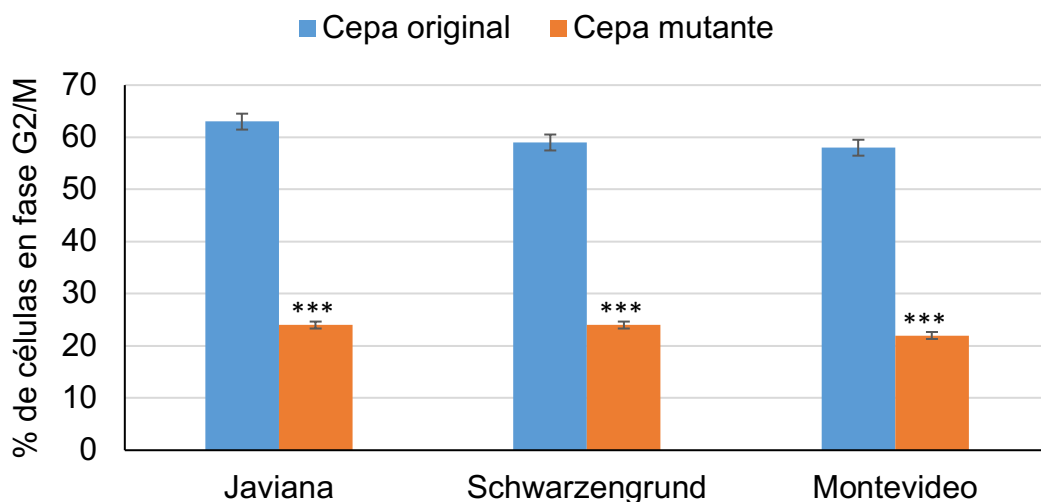


Figura 9. Porcentaje (\pm error estándar) de células infectadas con cepas de *S. enterica* ser. Javiana, Schwarzengrund y Montevideo, portadoras de la isla CDT (originales) y mutantes ($\Delta cdtB$) con arresto del ciclo celular en la fase G2/M. Adaptado de Rodríguez-Rivera et al.⁽¹¹⁵⁾ *** $P < 0.0001$.

En contraste, estudios *in vivo* con modelo murino sugieren que CDT favorece la supervivencia del hospedero y el establecimiento de infecciones crónicas asintomáticas.⁽¹¹⁷⁾ En este trabajo se comprobó que los ratones, infectados con cepas portadoras de CDT, presentaban un nivel reducido de expresión de los genes asociados con la respuesta inmune en el colon. En contraste, aquellos asociados con la respuesta inmune en el hígado tenían un nivel de expresión normal (Figura 10).

Estos hallazgos indican que las cepas portadoras de CDT, en las primeras fases de la infección, modulan la respuesta inmune del hospedero a nivel intestinal, donde

prácticamente no causan daño, a cambio de sostener una infección a largo plazo en otros sitios sistémicos.

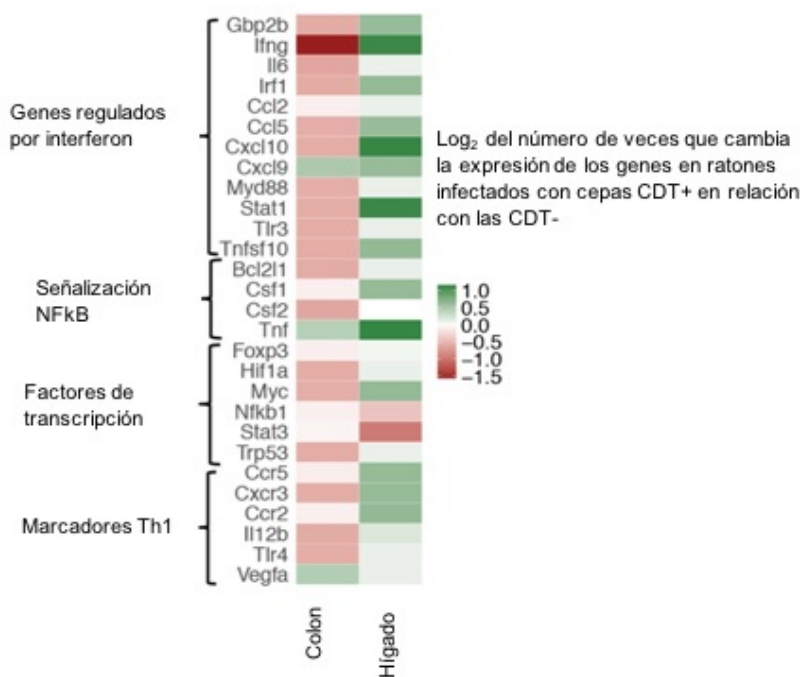


Figura 10. Mapa de calor que muestra el cambio en la expresión relativa de genes asociados con respuesta inmune en colon e hígado de ratones infectados con cepas portadoras de CDT y mutadas (CDT-). Adaptado de Del Bel Belluz et al.⁽¹¹⁷⁾

El mismo estudio de Del Bel Belluz et al.⁽¹¹⁷⁾ generó evidencias adicionales que demuestran que las cepas portadoras de CDT tienen un fenotipo menos virulento. Lo anterior a partir de un experimento *in vivo* donde se observó que el 100% de los ratones, infectados con cepas CDT+, sobrevivió hasta los 20 días post infección. En contraste, la supervivencia de los ratones infectados con cepas CDT- fue de apenas el 60% (P<0.05).

Estos hallazgos son congruentes con los resultados de otras investigaciones con cepas causantes de salmonelosis no tifoidea invasiva en humanos.⁽¹¹⁸⁾ En este trabajo, los ratones infectados con cepas CDT+ mostraron menor invasividad y no provocaron mortalidad cuando fueron inoculadas por vía intraperitoneal. Por el contrario, las cepas CDT- de los serotipos Dublin, Cholerassuis, Typhimurium y Enteritidis se mostraron altamente invasivas y mataron entre 40 y 100% de los ratones (Figura 11).

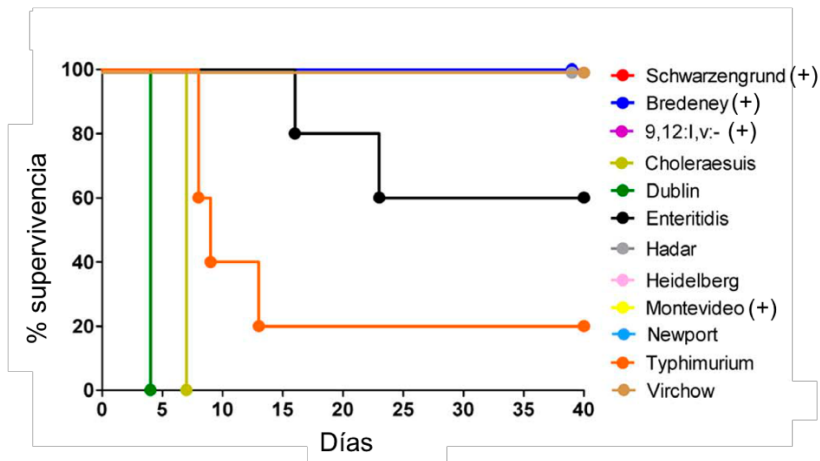


Figura 11. Supervivencia de ratones infectados con cepas no tifoideas de diversos serotipos causantes de infecciones invasivas en humanos. (+): indica las cepas portadoras de CDT. Adaptado de Suez et al.⁽¹¹⁸⁾

Hasta qué punto el comportamiento observado en el modelo murino es extrapolable a otras especies es un tema que debe ser abordado en estudios futuros. Sin embargo, el alto grado de conservación de los genes que codifican para la toxina en cepas no tifoideas sugiere que la misma debe ser relevante para la supervivencia del patógeno. De otra forma, esta isla genómica, que se presume fue adquirida por transferencia horizontal,⁽¹⁰⁷⁾ se habría degradado progresivamente o eliminado del genoma de estas cepas.

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE FACTORES DE VIRULENCIA

Salmonella posee un repertorio de factores de virulencia mucho más amplio que el abordado hasta ahora, pues el análisis se realizó en relación con las distintas fases de la patogénesis. De hecho, se han identificado un total 20 SPI, varias secuencias de fagos y múltiples genes de virulencia codificados fuera de las islas genómicas.⁽¹¹⁸⁾

Las islas de patogenicidad son parte de las llamadas islas genómicas, las cuales se presume fueron adquiridas por transferencia horizontal de genes y tienen la propiedad de conferir virulencia a la célula receptora. Deben su nombre a que constituyen

inserciones dentro del cromosoma. Como este concepto es de carácter muy general, se han propuesto los siguientes criterios que permiten identificar las SPI, aunque no todos son aplicables a las SPI que hasta ahora se han descrito:⁽¹¹⁹⁾

- 1) Codifican principalmente factores de virulencia (toxinas, adhesinas, invasinas).
- 2) Están presentes en cepas patogénicas de una especie y ausentes en cepas no patogénicas de la misma especie (o de especies relacionadas).
- 3) Presentan un contenido de G+C diferente, usualmente más bajo, que el promedio del cromosoma.
- 4) Pueden abarcar regiones genómicas relativamente grandes (>30 kb).
- 5) Se asocian con genes de ARNt o con secuencias de inserción en sus extremos.
- 6) Son regiones inestables, que suelen presentar inserciones, deleciones y/o mutaciones.

Dentro de las SPI, las primeras cinco son las que se han caracterizado con más profundidad⁽¹²⁰⁾. La Figura 12 resume el contenido genes presentes en las SPI 1 a 5 y la categoría funcional a la que pertenecen las proteínas que estos codifican.

Las SPI 1 y 2 fueron abordadas previamente, por su rol en los procesos de invasión y supervivencia intracelular. Por tanto, aquí sólo se describirán sus propiedades generales. La SPI1 es una inserción de aproximadamente 40 kb entre genes que son consecutivos en *E. coli* K12, un pariente cercano de *S. enterica*. Tiene un % de G+C promedio de 42, muy inferior al promedio del cromosoma (52%). Esta isla no está asociada con ningún gen de ARNt, aunque sí presenta zonas inestables, como lo demuestra la deleción de genes individuales y loci completos de la SPI1 en algunas cepas de la subespecie *enterica*.^(7,70,86,100)

La SPI2 es similar en tamaño a la SPI1 (≈40 kb), aunque a diferencia de esta, se encuentra insertada adyacente al gen ARNt *valV* y tiene una estructura de mosaico. La porción de la SPI2 que codifica el T3SS (≈25 kb) tiene un contenido de G+C de 43%. Está presente en *S. enterica* y ausente en *S. bongori*. Como se vio antes, estos genes son esenciales para la fase sistémica de la infección. La fracción más pequeña (≈15 kb) contiene el operón *ttr*, que codifica la tetratonato reductasa, necesaria para la respiración

anaeróbica en el ambiente intestinal. Está presente también en *S. bongori* y tiene un contenido de G+C de 54%.⁽¹²¹⁾

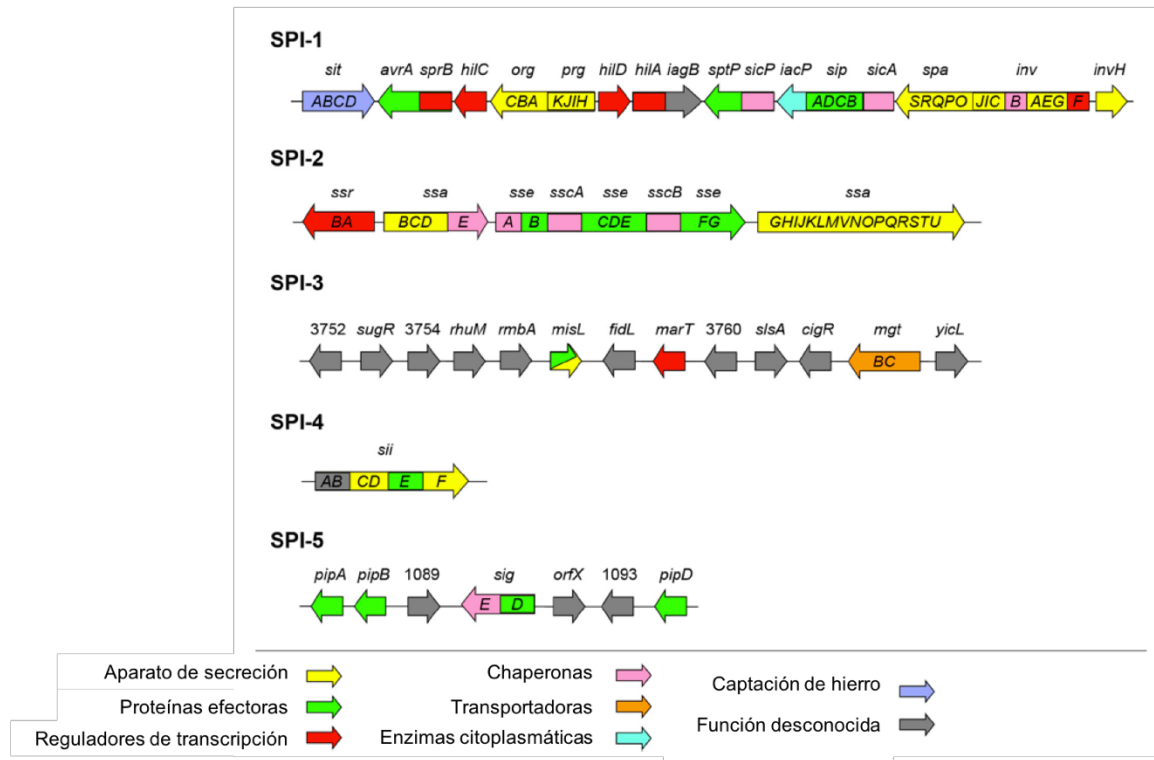


Figura 12. Representación esquemática de los genes presentes en las SPI 1 a 5 de *Salmonella Typhimurium*. Adaptado de Fábrega y Vila.⁽⁷⁷⁾

La inserción ubicada adyacente al locus ARNt *se/C* fue denominada como SPI3. Tiene un tamaño de 17 kb y un porcentaje de G+C de 47.5. Hasta ahora sólo se ha identificado la función de cuatro de las proteínas codificadas en esta isla. Una de ellas es un factor de adherencia (MisL), el cual se ha sugerido que también está involucrado en las infecciones persistentes. Otras dos proteínas, MgtC y MgtB, relacionadas con la captación de magnesio, son requeridas para la supervivencia intracelular; mientras que el último gen de función conocida codifica una proteína reguladora (MarT), que actúa a nivel local para activar la transcripción de MisL.⁽⁷⁷⁾ La región 5' de la SPI3, que codifica proteínas cuya función es desconocida, se considera una zona inestable, pues varios de estos genes están ausentes en cepas de *S. enterica* de varios serotipos.⁽¹²¹⁾

La SPI4 es un fragmento de 27 kb, con un contenido variable de G+C. Está conformada por un único operón (*sii*) que codifica un sistema de secreción de tipo 1 (T1SS). El T1SS exporta la adhesina afimbrial gigante codificada por el gen *siiE*, la cual funciona de modo similar a las hemolisinas secretadas por *Escherichia coli*, pues al adherirse a las células epiteliales puede formar un poro.⁽⁷³⁾ Debido a esta propiedad, se considera que la SPI4 contribuye tanto a la interacción inicial con el epitelio intestinal como a la persistencia crónica.⁽¹²²⁾ Esta isla por lo general presenta un alto grado de conservación entre los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*.⁽¹²¹⁾

La SPI5 es un locus pequeño (7.6 kb), adyacente al gen ARNt *serT* y presenta un contenido de G+C de 43.6%. Codifica principalmente proteínas efectoras, las cuales son translocadas a las células hospederas mediante los T3SS de las SPI 1 y 2. Por tanto, esta isla tiene una doble contribución al proceso infeccioso, pues codifica proteínas efectoras que intervienen tanto en la fase de invasión (operón *sigDE*, que codifica SopB y PipC), como en la infección sistémica (PipAB). Dado que la regulación transcripcional de los genes de la SPI5 está bajo control de HilA (SPI1) o del sistema regulador de dos componentes SsrAB (SPI2), por lo general la presencia de los genes de la SPI5 se correlaciona con la presencia de las islas de patogenicidad que codifican los sistemas de secreción con los que estos interactúan.⁽¹²¹⁾

El resto de las SPI han sido menos estudiadas y por lo general no están distribuidas de manera uniforme en la subespecie *enterica*. Por ejemplo, la SPI7 codifica el antígeno Vi (cápsula), un importante factor de virulencia que es específico para los serotipos Typhi, Dublin y Paratyphi C.⁽¹²¹⁾ De igual forma, las SPI 11 y 18 sólo están presentes en cepas tifoideas y en unos pocos serotipos de *S. enterica* no tifoidea. La SPI11 codifica la toxina tifoidea (CDT+pertussis), discutida previamente; mientras que en la SPI18 hay dos genes que codifican la hemolisina E (*hlyE*) y una invasina (*taiA*), factores asociados con colonización intestinal y persistencia.⁽¹²³⁾

Algunos genes de virulencia relevantes para la infección sistémica están codificados en secuencias de bacteriófagos. Tal es el caso de la enzima superóxido dismutasa 1 (SodCI), que protege a *Salmonella* de las especies reactivas de oxígeno generadas por

el sistema inmune del hospedero. En algunas cepas de la subespecie *enterica*, esta enzima está codificada en genes del bacteriófago Gifsy-2.⁽¹¹⁸⁾

Los plásmidos pueden ser también una fuente importante de genes de virulencia. Anteriormente se describió la contribución del plásmido de virulencia de *Salmonella* (pSLT) al proceso de patogénesis. Este plásmido porta el operón fimbrial *pef*, así como la región *spvRABCD* y el gen *rcK*, determinantes genéticos que contribuyen al fenotipo de alta invasividad en algunas cepas no tifoideas (Figura 13).⁽⁶⁷⁾

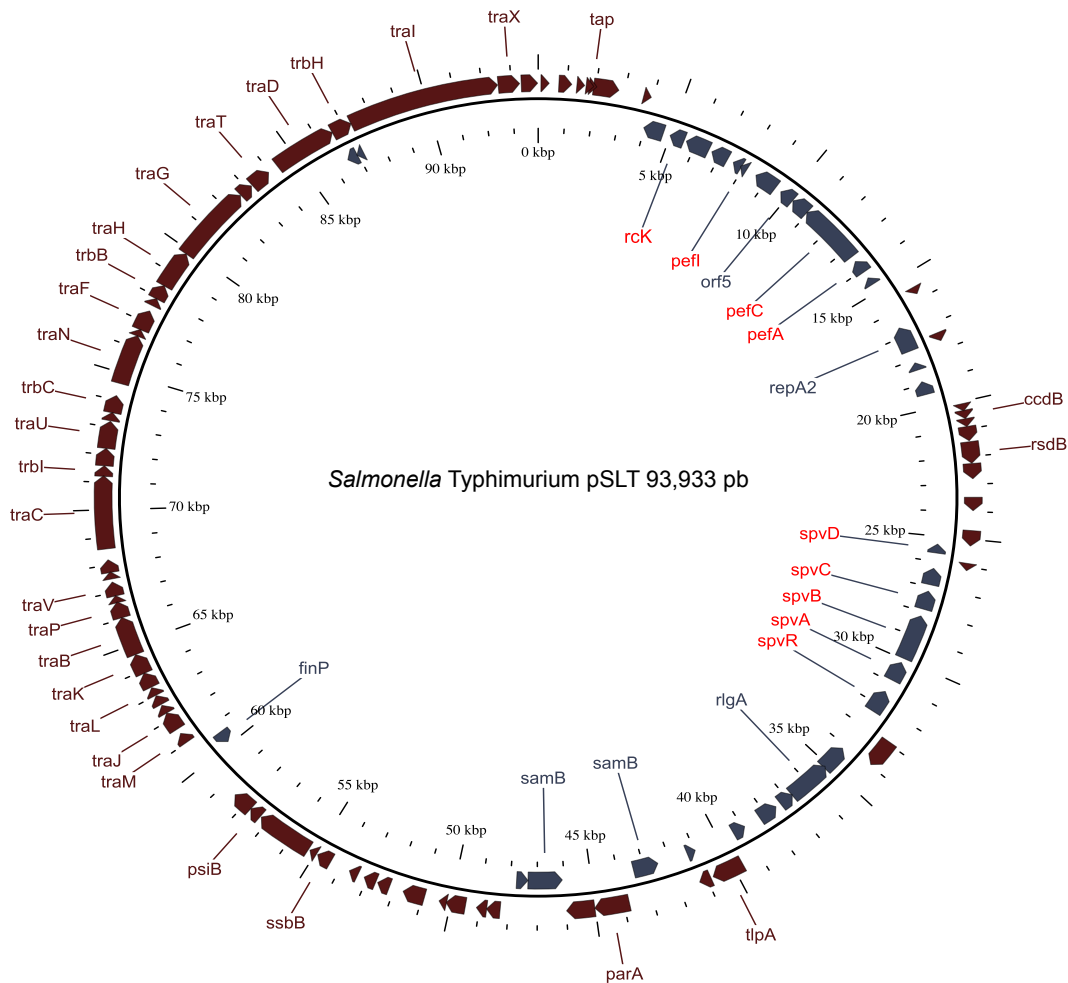


Figura 13. Secuencia completa del plásmido pSLT, de *Salmonella* Typhimurium (AE006471.2). Los genes están codificados con color de acuerdo con la hebra de ADN en la que están codificadas. Los factores de virulencia están resaltados en color rojo. Mapa circular generado con el programa GView.⁽¹²⁴⁾

Los plásmidos de tipo VirB/D4, presentes en algunos serotipos de *S. enterica*, suelen portar T4SS, los cuales constituyen unas versátiles maquinarias de virulencia. Las proteínas efectoras translocadas a las células eucariotas por esta vía, además de participar en a la invasión, en algunos patógenos Gram negativos juegan un papel importante para la multiplicación intracelular y las infecciones persistentes.^(82,125) La Figura 14 muestra la secuencia del plásmido IncFp96A29192-65, portador de un T4SS del tipo VirB/D4 y que se ha encontrado en algunas cepas de *S. enterica*.⁽¹²⁶⁾

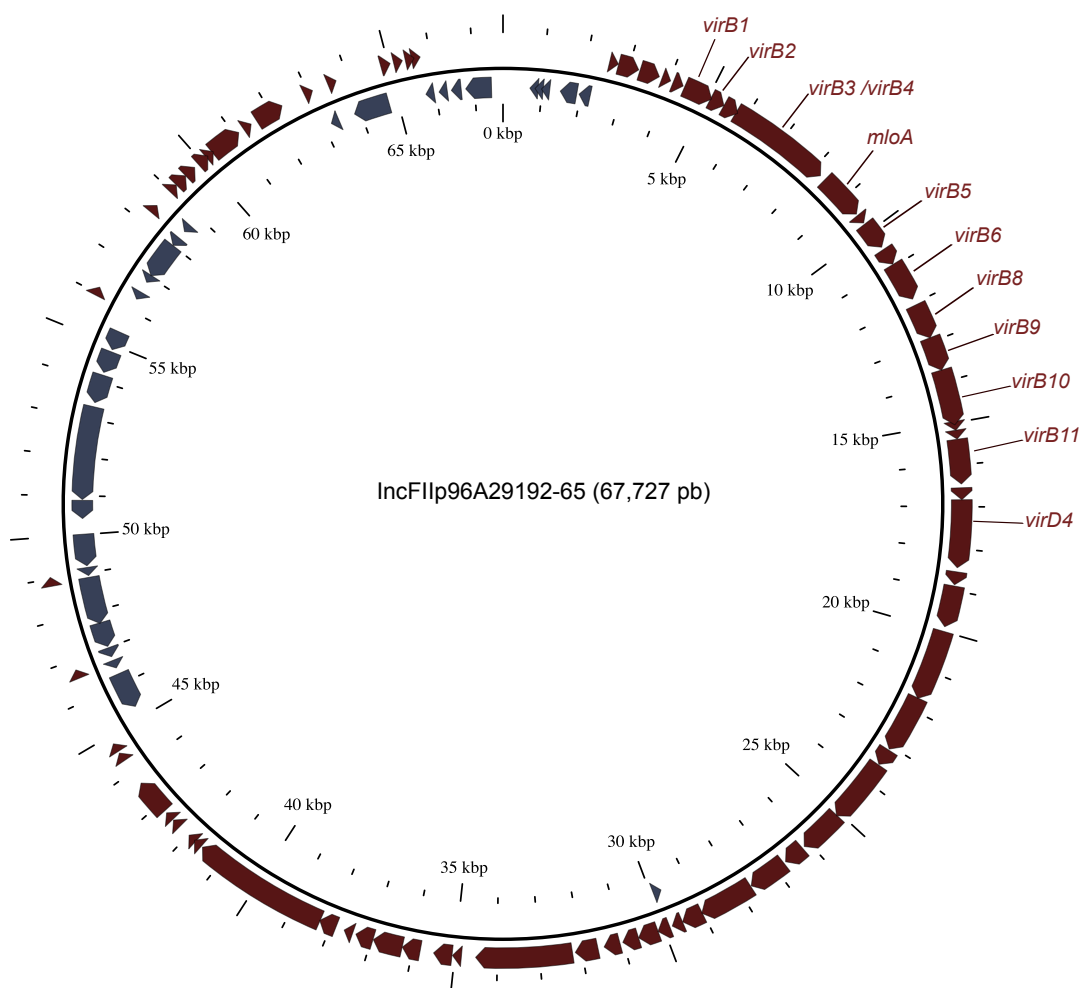


Figura 14. Secuencia completa del plásmido IncFIIp96A29192-65, descrito en *Salmonella* spp. (JQ418521.1). Los genes que codifican el T4SS están señalados en el mapa circular, generado con el programa GView.⁽¹²⁴⁾

Los plásmidos juegan también un importante papel en la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos, un factor que también contribuye a la persistencia de cepas que circulan en ciertos nichos ecológicos, como la producción animal, donde el empleo de antibióticos constituye una importante fuerza evolutiva.

RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

El incremento de la proporción de bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos (MDR) se considera una emergencia de salud pública a escala global.⁽¹²⁷⁾ Como el descubrimiento de nuevos antibióticos mermó drásticamente desde la década de 1990, en la actualidad son pocas las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones graves. Ante esta situación, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de antibióticos considerados esenciales, los cuales clasifica en tres grupos, según su importancia en medicina humana en caso de que dejaran de ser efectivos contra las infecciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Lista OMS de antibióticos, clasificados según su nivel de importancia en medicina humana⁽¹²⁸⁾

Importancia crítica		Muy importantes	Importantes
Máxima prioridad	Gran prioridad		
Cefalosporinas ¹	Aminoglucósidos	Anfenicoles	Nitrofurantoínas
Glicopéptidos	Carbapenémicos	Cefalosporinas ²	Nitroimidazoles
Macrólidos	Monobactámicos	Sulfonamidas	Aminociclitoles
Polimixinas	Penicilinas	Tetraciclinas	
Quinolonas		Penicilinas ³	

¹Sólo de tercera, cuarta y quinta generación.

²Sólo de primera y segunda generación.

³Se refiere a penicilinas antiestafilocóccicas.

Entre las bacterias Gram negativas, incluyendo a *Salmonella*, los perfiles de resistencia más preocupantes son los que involucran a cefalosporinas de tercera generación (3GC) y a las quinolonas.⁽¹²⁷⁾ Aunque en México no hay abundancia de datos al respecto, en una revisión bibliográfica publicada en 2010 se reportan aumentos considerables en la frecuencia de cepas de *Salmonella* spp., de origen clínico, resistentes a penicilinas y a sulfonamidas en el período 1994-2002 (Figura 15). Asimismo, desde esa fecha se observaba resistencia a 3GC en 12% de las cepas.⁽¹²⁹⁾

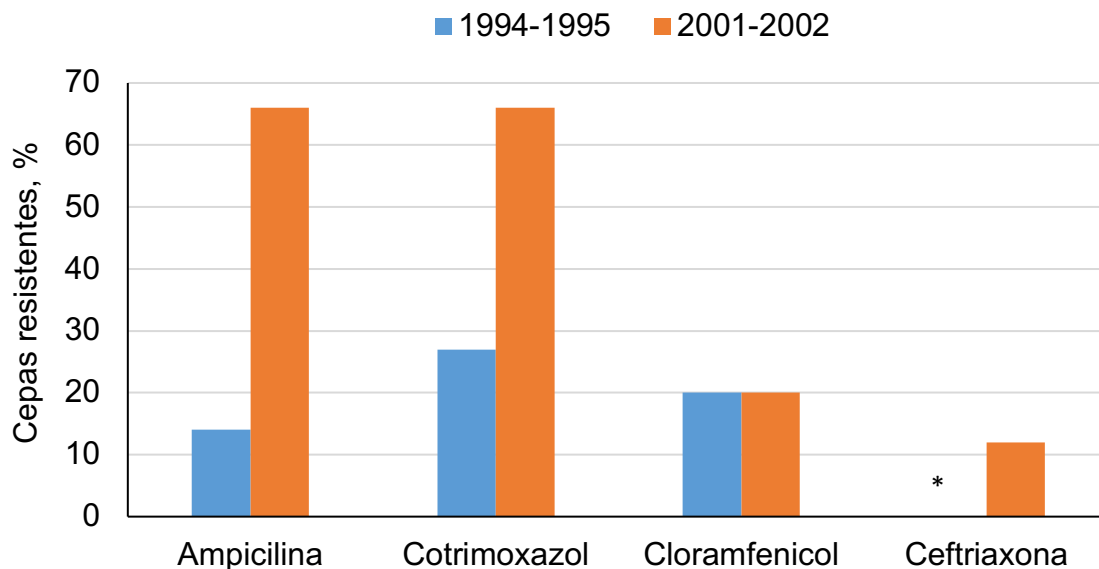


Figura 15. Frecuencia de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a diferentes antibióticos en el período 1994-2002. *Sin datos para el período 1994-1995.

Por lo general, la disponibilidad de datos sobre RAM en *Salmonella* y en otros patógenos es limitada, sobre todo en países en vías de desarrollo. No obstante, hay evidencia experimental que identifica a los alimentos de origen animal, incluso la carne de bovino, como fuentes relevantes de *Salmonella* MDR.^(130,131) Esto ha llevado a discusiones controvertidas en relación con el papel que juega el uso de antibióticos en producción animal en el creciente problema de RAM.

Según datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), el sector agropecuario de Estados Unidos y de la Unión Europea consume el 75% del total de antibióticos que se utiliza en esas regiones.⁽¹³²⁾ Asimismo, este informe señala

que tetraciclinas, penicilinas y macrólidos representan, en conjunto, el 75% del total de antibióticos usados para fines veterinarios. Estos datos son congruentes con los reportes de uso extensivo de oxitetraciclina en camaronicultura en México, que fue el medicamento más consumido (65.9% de frecuencia de uso) en granjas de cultivo de camarón del estado de Sonora en 2007.⁽¹³³⁾ También coincide con la aprobación que establece el Acuerdo para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios en México, el cual autoriza para uso veterinario antibióticos de todos los grupos de la lista OMS, incluso algunos de importancia crítica y máxima prioridad, como ceftriaxona y ciprofloxacino.^(134,135)

Ante esta situación, no es sorprendente observar las altas tasas de resistencia a múltiples antibióticos que manifiestan aislamientos de *S. enterica* obtenidos de animales y de carne. En una revisión sistemática de 25 investigaciones realizadas en cinco países (Argentina, Brasil, Colombia, México y Venezuela) de América Latina (Cuadro 6), la proporción de estudios en los que se encontraron cepas de *Salmonella* resistentes a varias clases de antibióticos de importancia crítica es alarmante.⁽¹³⁾

Esta misma tendencia se ve reflejada en los hallazgos de investigaciones realizadas en México. La excepción son las quinolonas, para las cuales aún se observa una baja proporción de resistencia en cepas asociadas con animales. Por ejemplo, en un estudio que abarcó cuatro estados de la República Mexicana, Zaidi et al.⁽³⁸⁾ analizaron la susceptibilidad a antibióticos de cepas de *S. enterica* obtenidas de personas enfermas o portadoras asintomáticas, así como de carne e intestinos de pollo, cerdo y res. En este trabajo, no se detectó resistencia a ciprofloxacino en ningún aislamiento, mientras que la proporción de cepas resistentes a ceftriaxona fue de 14.5% en personas enfermas y fluctuó entre 1.2 y 4.2% en portadores asintomáticos y muestras de origen animal. En contraste, se observó un mayor porcentaje de cepas resistentes a tetraciclinas (26.1-55.3%, según el origen de la cepa), estreptomicina (45.9-73.1%) y sulfisoxazol (35.4-62.1%).

Cuadro 6. Estudios latinoamericanos en los que se observó resistencia a diferentes clases de antibióticos en aislamientos de *Salmonella* spp. provenientes de carne, derivados cárnicos y huevo. Adaptado de Quesada et al.⁽¹³⁾

Clase de antibiótico	Medicamento	Estudios en que se observó resistencia	Número total de estudios
Aminoglucósidos	Gentamicina	8	18
	Estreptomina	15	18
	Kanamicina	7	9
Quinolonas	Ácido nalidíxico	19	21
	Ciprofloxacino	8	20
3GC	Ceftriaxona	4	8
	Cefotaxima	1	7
Sulfonamidas	Sulfonamida	7	8
	Sulfisoxazol	2	4
Anfenicoles	Cloramfenicol	15	22
Tetraciclinas	Tetraciclinas	20	22

Estudios más recientes, realizados en el estado de Jalisco, reportan resultados semejantes. Aunque ya se empiezan a encontrar cepas resistentes a quinolonas (0-20%) y a 3GC (0-7%), estas se presentan en proporción mucho más baja que las resistentes a tetraciclinas (41-46%) y a aminoglucósidos (36-42%).^(12,56,60) Asimismo, en otro muestreo de carne molida de res, realizado en la Ciudad de México, de las 19 cepas de *Salmonella* que se aislaron, el 75% resistió tetraciclina, entre el 85 y el 95% resistió penicilinas y el 65% resistió sulfonamidas.⁽⁶¹⁾ En cambio, no se observó resistencia a 3GC y sólo un aislamiento resistió pefloxacino.

En general, la evidencia científica disponible indica que la emergencia y la diseminación de RAM en cepas de *S. enterica* dista mucho de estar bajo control. Por el contrario, se mantienen o aumentan las tasas de resistencia a antibióticos tradicionalmente usados en producción animal (ej. tetraciclinas); mientras que se comienza a observar resistencia a antibióticos más potentes, tales como quinolonas y 3GC. Aunque la tendencia hacia

perfiles de resistencia más severos es clara, aun no se han explorado en detalle los determinantes genéticos y los mecanismos de diseminación de genes de RAM que pudieran estar influyendo en la evolución de las poblaciones de *Salmonella* asociadas con producción animal.

Origen de los genes de resistencia

Un cuestionamiento básico al abordar el tema de RAM es el relativo al origen de los genes que permiten a las bacterias multiplicarse en presencia de antibióticos. Estudios moleculares han evidenciado que los microbios que producen antibióticos de manera natural, poseen genes que codifican mecanismos de resistencia para evitar el efecto tóxico de los mismos. Por ello, se ha postulado que los organismos productores en el ambiente constituyen el principal origen de los genes de RAM.

Un ejemplo que ilustra lo anterior es la *Saccharopolyspora erythraea*, una bacteria del suelo que produce eritromicina de forma natural. Este organismo posee varios genes que codifican para enzimas (ej. estererasas y fosfotransferasas) que modifican la eritromicina. Además, porta un gen (*ermE*) que codifica para una ARNr metiltransferasa, la cual modifica la subunidad ribosomal 23S, bloqueando de esta forma la unión de la eritromicina con el ribosoma y, por tanto, resistiendo su efecto.⁽¹³⁶⁾

También se han encontrado genes de RAM en bacterias aisladas de suelo virgen (nunca sujeto a actividad antropomórfica). Por ello, se infiere que los genes de resistencia, presentes en organismos productores, fueron transferidos de manera horizontal a bacterias no productoras, en un largo proceso evolutivo.⁽¹³⁷⁾ Así, los genes de organismos productores se comportan como genes de resistencia en organismos no productores.

Tal hipótesis es respaldada por estudios genómicos que revelaron la presencia de un clúster de genes de resistencia a vancomicina muy similar en actinobacterias productoras de vancomicina y en *Enterococcus* spp. resistente a este medicamento (Figura 16).⁽¹³⁸⁾ Por tanto, resulta obvio que, mientras algunas bacterias resisten antibióticos de manera

natural, otras debieron usar algún mecanismo de movilización y captura de ADN que hiciera viable el flujo de genes desde un organismo productor a otro no productor.

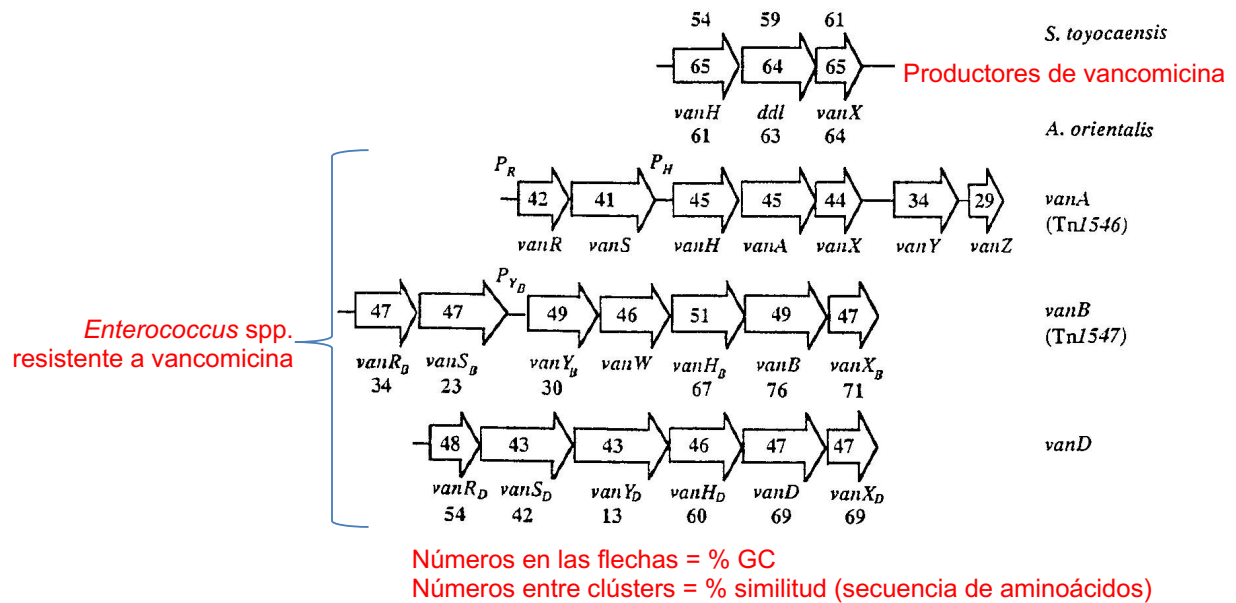


Figura 16. Comparación del clúster de genes de resistencia a vancomicina (*vanHAX*) de *Enterococcus* spp. con el de actinobacterias productoras del glicopéptido. Adaptado de Mazel y Davies.⁽¹³⁸⁾

Mecanismos de RAM natural o intrínseca

Como su nombre lo indica, la resistencia natural se presenta como una propiedad intrínseca de una especie bacteriana. Es decir, todos los organismos de una misma especie resisten el antibiótico. Además, esta resistencia existía en el organismo, aunque el mismo no se hubiera expuesto al antibiótico previamente. Al ser una propiedad inherente a la especie, por lo general el gen que codifica la resistencia se encuentra en el cromosoma.⁽¹³⁹⁾

Los dos principales mecanismos de resistencia intrínseca que se han identificado son la permeabilidad reducida y las bombas de eflujo activo. La base molecular de la permeabilidad reducida, un fenómeno recurrente en bacterias Gram negativas, es la presencia de la membrana externa, que es impermeable a muchas moléculas. En

cambio, la pared celular de las bacterias Gram positivas es mucho más porosa y, por tanto, permeable a un mayor número de compuestos químicos (Figura 17).

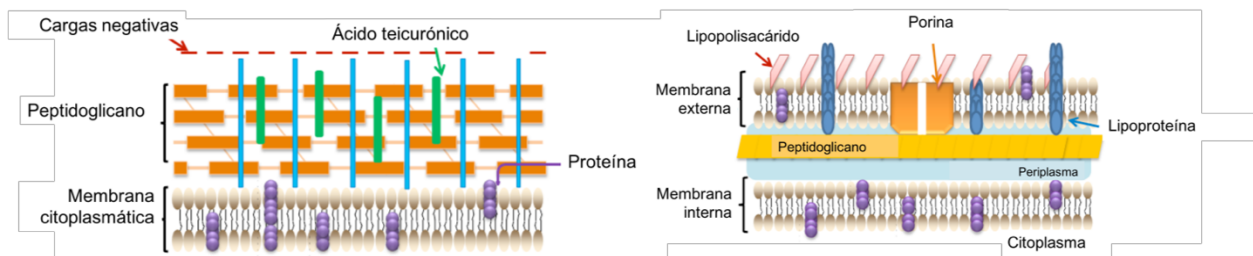


Figura 17. Estructura de la pared celular en bacterias Gram positivas (izquierda) y Gram negativas (derecha). En estas últimas, las moléculas sólo pueden ingresar a través de los poros (porinas) creados por algunas proteínas en la membrana externa. Imagen adaptada de Sharma et al.⁽¹⁴⁰⁾

Las llamadas bombas de eflujo, por su parte, pueden expulsar una gran variedad de antibióticos, mediante transporte activo, fuera de la célula. Aunque están presentes en todo tipo de bacterias, se considera uno de los principales factores detrás del perfil MDR en bacterias Gram negativas.⁽¹⁴¹⁾ Algunas bombas de eflujo muestran especificidad por cierto tipo de molécula (ej. bombas de eflujo de tetraciclinas), mientras que otras son de amplio espectro.

En organismos procariontes se han descrito 6 grupos o familias de proteínas transmembrana que funcionan como bombas de eflujo. Sólo una de ellas, denominada casete ABC de unión con ATP o “ATP-binding cassette (ABC) family”, utiliza el ATP como fuente de energía para el transporte de las moléculas con las que interactúa. Las restantes utilizan la energía electroquímica proveniente de los gradientes iónicos transmembranales. Estos cinco grupos están conformados por la superfamilia facilitadora mayor o “Major Facilitator Superfamily” (MFS), la familia extrusora de multicompuestos y toxinas o “Multidrug and toxin extrusion (MATE) family”, la familia pequeña de resistencia múltiple o “Small multidrug resistance (SMR) family”, la superfamilia RND o “Resistance-Nodulation-cell Division (RND) superfamily” y la familia

proteobacteriana de eflujo de compuestos antimicrobianos o “Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) family” (Figura 18).⁽¹⁴²⁾

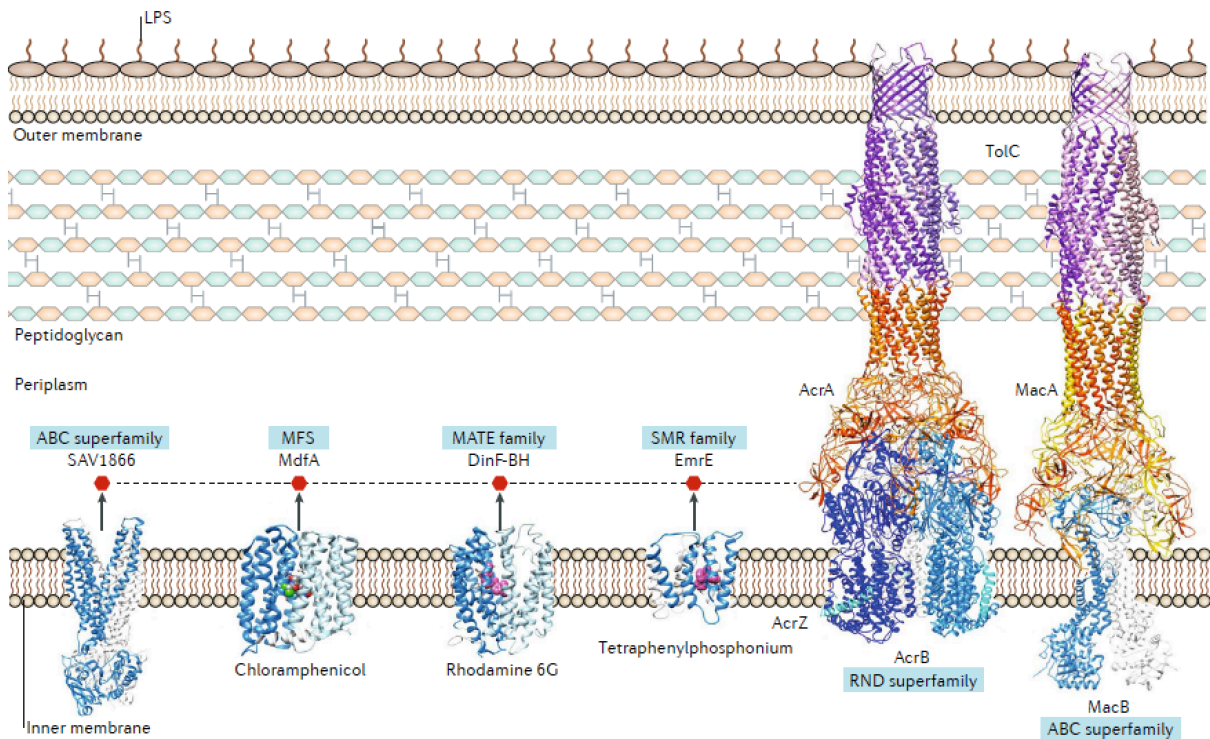


Figura 18. Representación esquemática de las familias bacterianas de bombas de eflujo activo. Nótese cómo algunos sistemas exportan las sustancias tóxicas al periplasma, mientras que las más grandes las transportan directamente al espacio extracelular. Imagen tomada de Du et al.⁽¹⁴²⁾

Entre las familias descritas, la RND es la mejor caracterizada, por ser la de mayor relevancia clínica en materia de RAM. Se ha comprobado que, cuando el sistema RND es sobre-expresado por las bacterias, les confiere fenotipos de multirresistencia a una amplia gama de antibióticos.⁽¹⁴³⁾

Las bombas de tipo RND están compuestas por un complejo tripartito de proteínas. En *Salmonella* y en otras bacterias Gram negativas, AcrB es el transportador de membrana interna. Éste captura su sustrato desde la bicapa de fosfolípidos de la membrana interna o desde el citoplasma y lo transporta hacia el medio extracelular a través de la proteína

de membrana externa TolC. La cooperación entre AcrB y TolC es mediada por AcrA, una proteína accesoria del periplasma (Figura 18).

Se ha determinado que el eflujo activo también juegan un papel importante en los procesos de patogénesis, al exportar fuera de la célula las sustancias tóxicas producidas por la respuesta inmune del hospedero.⁽¹⁴⁴⁾ En un experimento con *Salmonella* Typhimurium, se observó que los genes *macAB*, que codifican una bomba de eflujo específica para macrólidos, son requeridos también para la supervivencia intracelular. En este trabajo, las cepas mutantes *macAB*- no sobrevivieron en macrófagos competentes que inducían estrés oxidativo mediante ROS, pero sí lo hicieron en macrófagos deficientes en ROS.⁽¹⁴⁵⁾

En otros estudios con cepas originales y mutantes de *Salmonella* Typhimurium, se comprobó que la eliminación de los genes *acrAB* afectó significativamente la capacidad del patógeno para adherirse e invadir células epiteliales y macrófagos (*in vitro*), así como para colonizar y persistir en pollos.^(146,147)

Por estas y otras evidencias, se presume que la función original de las bombas de eflujo era contribuir a la supervivencia dentro del hospedero. No obstante, la capacidad de algunas de ellas para exportar una gran variedad de moléculas, devino en un mecanismo fortuito de resistencia a múltiples antibióticos. Por ello, la investigación en este campo es muy intensa. Si se lograra entorpecer o inactivar los mecanismos de eflujo activo, se podría recuperar la actividad antimicrobiana de muchos antibióticos que actualmente son resistidos por muchas bacterias Gram negativas.

Mecanismos de RAM adquirida

A diferencia de la resistencia natural, la resistencia adquirida no ocurre en todos los organismos de una misma especie, sino que se presenta cuando algunos individuos sufren mutaciones cromosomales o adquieren material genético externo por transferencia horizontal, procesos que se favorecen con el uso de antibióticos.⁽¹⁴¹⁾

Si bien la resistencia natural representa un desafío para el tratamiento de ciertos agentes infecciosos, la resistencia adquirida se puede heredar verticalmente a la descendencia

(cuando es causada por mutaciones) o incluso se puede diseminar entre bacterias de diferentes especies. Por ello, el estudio de los determinantes genéticos asociados con la resistencia adquirida es también de la mayor relevancia.

RAM adquirida por mutaciones

Se han descrito varias mutaciones cromosomales asociadas con resistencia a diferentes clases de antibióticos, principalmente a quinolonas, polimixinas y aminoglucósidos.⁽¹⁴⁸⁾ El Cuadro 7 presenta un resumen de los genes involucrados en RAM mediada por mutaciones, la clase de antibiótico que es afectada por éstas, así como los aminoácidos que se sustituyen en el polipéptido codificado por cada gen.

La parte del cromosoma bacteriano donde se encuentran los genes relacionados con el metabolismo de ácidos nucleicos, especialmente de la enzima ADN girasa (*gyrAB*, *parCE*), se ha denominado como región determinante de resistencia a quinolonas. Lo anterior en virtud de que se ha observado una fuerte correlación entre estas mutaciones y la resistencia a quinolonas en las cepas que las portan.⁽¹⁴⁹⁾

Por otra parte, en algunas enterobacterias, la mutación de los genes *pmrAB*, que codifican enzimas que modifican el lipopolisacárido de la membrana externa, previene la asociación de este con las polimixinas y por tanto, el efecto tóxico sobre la célula.⁽¹⁵⁰⁾ Sin embargo, la resistencia a polimixinas en *S. enterica* no muestra una buena correlación con estas mutaciones sino más bien con el nivel de expresión de los genes *pmrAB*, el cual puede aumentar drásticamente bajo condiciones de estrés en la membrana externa.⁽¹⁵¹⁾ Por último, las mutaciones en el ARN ribosomal previene la interacción del ribosoma con los aminoglucósidos, evitando que los mismos interfieran con la síntesis de proteínas.⁽¹⁴¹⁾

En la actualidad, existen herramientas bioinformáticas de libre acceso, tales como ResFinder⁽¹⁴⁸⁾, del Centro de Epidemiología Genómica de Dinamarca (<http://www.genomicepidemiology.org>), que permite identificar la presencia de mutaciones cromosomales asociadas con RAM en los genomas de varias especies de enterobacterias, incluso *Salmonella* spp.

Cuadro 7. Mutaciones identificadas en genes de *S. enterica* que confieren resistencia a diferentes clases de antibióticos

Gen	Mutaciones descritas (aminoácidos) ¹	Fenotipo de RAM
<i>gyrA</i>	A67P, D72G, V73I, G81C, G81S, G81H, G81D, D82G, D82N, S83Y, S83F, S83A, D87N, D87G, D87Y, D87K, L98V, A119S, A119E, A119V, A131G, E139A	Quinolonas
<i>gyrB</i>	Y421C, R438L, S464Y, S464F, E466D	Quinolonas
<i>parC</i>	T66I, G78D, S80R, S80I, E84K, E84G	Quinolonas
<i>parE</i>	M438I, E454G, S458P, V461G, H462Y, A499T, V514G, V521F	Quinolonas
<i>pmrA</i>	G15R, G53E, G53R, R81C, R81H	Colistina
<i>pmrB</i>	L22P, S29R, T92A, P94Q, E121A, S124P, N130Y, T147P, R155P, T156P, T156M, V161M, V161L, V161G, E166K, M186I, G206W, G206R, S305R	Colistina
16S <i>rrsD</i>	g.C1065T, g.C1192T	Aminoglucósidos

¹Las mutaciones en el gen 16S *rrsD* están señaladas en secuencias nucleotídicas.

RAM mediada por adquisición de material genético externo

La adquisición de material genético externo puede ocurrir por tres mecanismos principales: transformación, conjugación y transducción. La primera ocurre cuando, al morir una bacteria, otra célula competente absorbe parte del material genético que se libera en el ambiente. Por su parte, la transducción tiene lugar cuando la bacteria adquiere nuevos genes cuando es infectada por un bacteriófago. Finalmente, la conjugación es el proceso mediante el cual se integra ADN externo en forma de

plásmidos y/o de elementos de integración y conjugación, tales de como integrones y transposones.⁽¹⁵²⁾

Aunque los tres mecanismos de adquisición definidos pueden aportar genes de RAM, el de mayor relevancia es la conjugación, por ser el que tiene un mayor potencial de diseminación. Esto se debe a que la conjugación requiere del contacto directo entre dos células bacterianas a través de los pili o adhesinas presentes en la superficie celular, por lo que el proceso de intercambio de ADN está más protegido y es más eficiente que en un proceso de transformación. Además, la conjugación puede ocurrir entre bacterias la misma especie o de diferentes especies, a diferencia de la transducción, debido a que los fagos no tienen un rango muy amplio de hospederos bacterianos.^(152,153)

La conjugación mediada por plásmidos y por integrones representa uno de los principales mecanismos de diseminación de genes de RAM en patógenos de importancia clínica y son, por tanto, lo más estudiados. Ambas maquinarias de conjugación permiten la transferencia de varios genes de RAM de manera simultánea. Por tanto, una célula receptora que anteriormente era pansusceptible, puede convertirse en panresistente después de un evento de conjugación. Y posteriormente, la célula receptora se convierte en donante, lo que contribuye a exacerbar la difusión del material genético que confiere resistencia.⁽¹⁵⁴⁾ La Figura 19 ilustra el potencial de diseminación de genes de RAM asociado con estos elementos móviles: un solo plásmido porta un integrón de clase 1, asociado con cinco genes de resistencia, así como otros cuatro genes de RAM fuera del integrón.

Algunos investigadores han tratado de desarrollar intervenciones encaminadas a prevenir la propagación de plásmidos, una estrategia que sin duda podría contener significativamente la diseminación de genes de RAM. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta área son limitados.^(155,156)

Con respecto a los integrones, estos pueden ser tanto de origen cromosomal como plasmídico. Funcionan como plataformas de integración de ADN que permiten a las bacterias captar marcos abiertos de lectura contenidos en lo que se conoce como “cassetes de genes” (Gc) exógenos y convertirlos en genes funcionales, al asegurar su expresión.

Los Gc tienen forma circular y poseen un sitio de unión (*attC*) en su estructura. El integrón, por su parte, está compuesto por un gen *intl*, que codifica una integrasa que cataliza la incorporación o escisión de los Gc mediante la recombinación en un sitio específico (*attI*) y un promotor responsable de la expresión del Gc recién integrado (Figura 20).⁽¹⁵⁷⁾ De esta forma, los genes de RAM recién incorporados pueden ser expresados de manera inmediata y, en caso de que no exista selección positiva de los mismos en el medio, pueden ser escindidos del genoma por la integrasa.

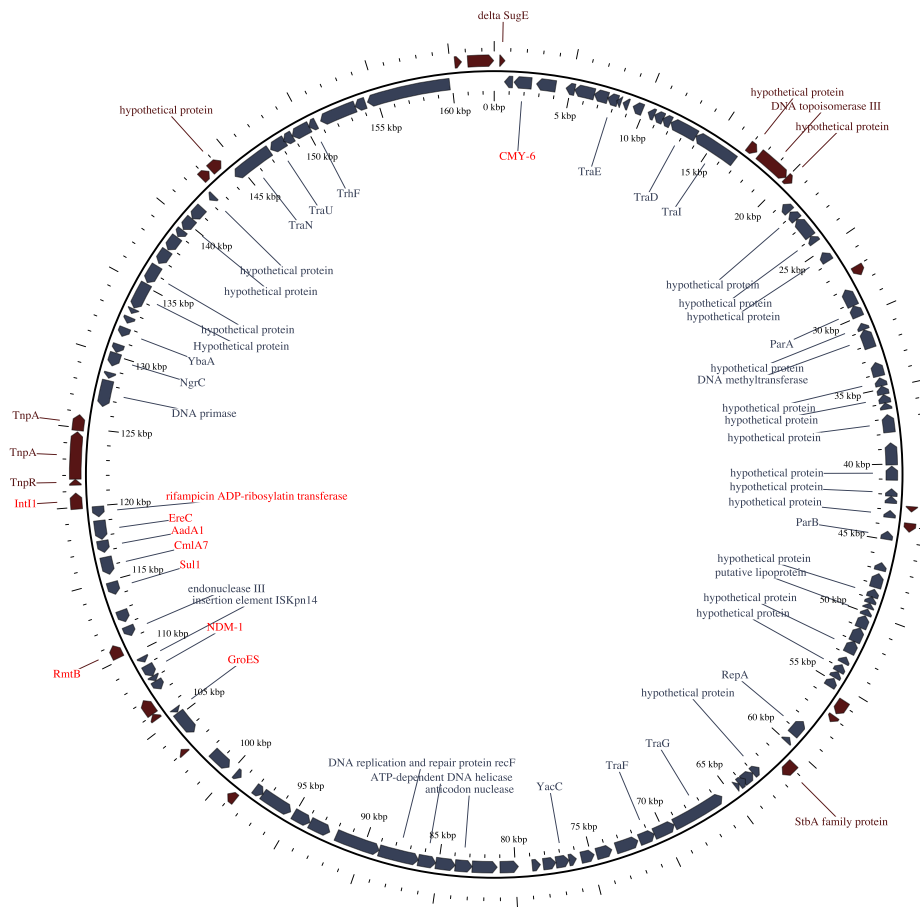


Figura 19. Mapa circular del genoma del plásmido IncA/C2 (JN157804) descrito por primera vez en *Klebsiella pneumoniae*. El integrón clase 1 y los genes de RAM están resaltados en color rojo. Mapa generado con el programa GView.⁽¹²⁴⁾

Aunque se han descrito cinco tipos de integrones, los de clase 1 son los más comúnmente encontrados en patógenos de interés clínico. Además, la mayoría de los Gc de resistencia conocidos (más de 80) pertenecen también a integrones de clase 1.

Esto incluye genes de resistencia contra todos los β -lactámicos y aminoglucósidos conocidos, así como contra cloramfenicol, trimetoprim, estreptomina, rifampin, eritromicina, fosfomicina, lincomicina y antisépticos del grupo de los compuestos de amonio cuaternario.⁽¹⁵⁸⁾

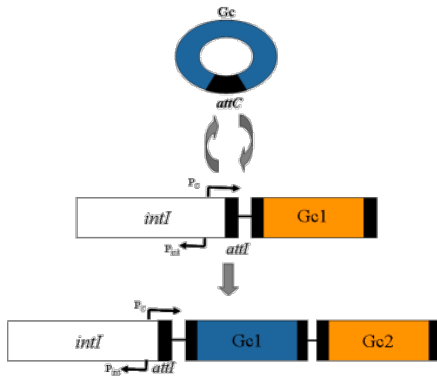


Figura 20. Mecanismo de integración de cassetes de genes en un integrón. Imagen tomada de <http://integrall.bio.ua.pt/?intro>.

La forma bidireccional en que operan los integrones (integración y escisión), conlleva a que algunas bacterias porten integrones vacíos, sin ningún Gc, mientras que otras pueden tener más de 10, según la especie de que se trate.⁽¹⁵⁷⁾ En *S. enterica* se han reportado integrones clase 1 con arreglos de hasta 11 Gc (acceso AY963803 en base de datos INTEGRALL). No obstante, los Gc de RAM más comúnmente encontrados, en cepas de *S. enterica*, son los que confieren resistencia a sulfonamidas y a aminoglucósidos.⁽¹³⁰⁾

Tomando en cuenta lo anterior, la determinación del perfil de plásmidos e integrones, en los estudios genómicos, resulta un análisis clave para valorar el genotipo de resistencia y el potencial de diseminación de genes de RAM que presenta la población del patógeno bajo estudio. Al igual que para la resistencia asociada con mutaciones, existen herramientas bioinformáticas de libre acceso para realizar estos análisis en los genomas bacterianos. En el caso de los plásmidos, uno de los programas es PlasmidFinder;⁽¹⁵⁹⁾ mientras que para los integrones está disponible la base de datos INTEGRALL

(<http://integrall.bio.ua.pt>), en la que se puede realizar la predicción de los integrones que portan los genomas bajo estudio.

Genes involucrados en RAM adquirida

El desarrollo de RAM en una población bacteriana obedece a la adquisición de genes que codifican factores que realizan alguna de las siguientes funciones:⁽¹⁶⁰⁾

- 1) Enzimas que inactivan antibióticos mediante su degradación o modificación estructural.
- 2) Modificación de la molécula diana del antibiótico.
- 3) Activación de bombas de eflujo de antibióticos.

En gran medida, la creciente resistencia de *Salmonella* spp. a penicilinas y cefalosporinas se debe a la adquisición de genes que codifican β -lactamasas, enzimas que hidrolizan estos antibióticos.⁽¹⁶¹⁾ Las β -lactamasas son un grupo heterogéneo de enzimas (>700),⁽¹⁶⁰⁾ algunas de las cuales tienen afinidad por un limitado número de β -lactámicos, mientras que otras son de espectro extendido, también denominadas como ESBL, por sus siglas inglesas.⁽¹⁶²⁾

Debido a que los β -lactámicos de amplio espectro son de importancia crítica para la medicina humana, especialmente las 3GC y los carbapenémicos,⁽¹²⁸⁾ la presencia de genes que codifican ESBL son de especial interés. Dentro de las ESBL descritas en *S. enterica*, las más preocupantes desde el punto de vista clínico son las no inhibidas por ácido clavulánico. Esto incluye a las ESBL de los grupos 1 y 3 del esquema de clasificación de β -lactamasas propuesto por Bush.⁽¹⁶³⁾ Las ESBL del grupo 1 corresponden a la familia de enzimas AmpC, codificadas por los genes blaCMY y son capaces de hidrolizar todos los β -lactámicos conocidos, excepto los carbapenémicos. Las del grupo 3 son las temidas metalobetalactamasas, codificadas por los genes blaNDM-1, blaIMP, blaVIM, entre otros, que degradan todos los β -lactámicos, incluso los carbapenémicos. Ambos tipos de ESBL se han encontrado tanto en genes cromosomales como en plásmidos. Esto último representa un riesgo adicional de

diseminación, pues el plásmido se puede transmitir por conjugación, como se vio anteriormente.

Las demás enzimas son inhibidas por ácido clavulánico, aunque algunas de ellas (ej. las codificadas por genes blaTEM, del grupo 2b) son también de espectro extendido (Cuadro 8). De hecho, las blaTEM parecen ser las ESBL más ampliamente distribuidas en *S. enterica*, según la base de datos “Resistome Tracker”,⁽¹⁶⁴⁾ de la Administración de Medicinas y Alimentos (FDA) de Estados Unidos, la cual concentra información de todos los aislamientos de *Salmonella*, disponibles en el Centro de Información y Biotecnología de Estados Unidos (NCBI), que tienen información sobre genotipo de RAM (Figura 21).

Cuadro 8. Genes de resistencia a β-lactamasas, su clasificación según el esquema de Bush, tipo de β-lactámico que hidrolizan y su localización más frecuente

Genes	Clasificación ¹	β-lactámico afectado / ubicación frecuente
blaTEM	2b (ESBL)	Penicilinas y 3GC / plásmidos
blaSHV		
blaCTX-M		
blaCARB	2c	Penicilinas / cromosoma y plásmidos
ampC	1* (ESBL)	Todos menos los penems / cromosoma y plásmidos
blaCMY		
blaVIM	3* (ESBL)	Todos / cromosoma y plásmidos
blaIMP		
blaNDM-1		

¹Esquema de Bush.⁽¹⁶³⁾ *ESBL no inhibidas por ácido clavulánico.

La información de Resistome Tracker se debe usar con cautela, pues sólo contiene datos de los aislamientos globales, que han sido secuenciados y que están disponibles en

NCBI. Por ello, no sería riguroso realizar inferencias sobre la asociación entre genes de RAM y sus posibles fuentes y/o distribución temporal. No obstante, la base de datos permite obtener un panorama general sobre cuáles son los genes de RAM más frecuentes en cepas de *Salmonella* no tifoidea a escala global. En este sentido, se puede observar que en todas las especies, incluso los humanos, las ESBL más frecuentes son las del grupo 2b, especialmente las blaTEM (Figura 21). Además, aunque en menor proporción, las cepas de todas las fuentes también portan enzimas AmpC (blaCMY), que resisten el ácido clavulánico. Al respecto, se ha sugerido que la amplia distribución de ambos grupos de ESBL obedece a que sus genes codificantes son portados en plásmidos, lo que facilita su diseminación.^(162,165)

Entre los antibióticos que son inactivados por modificación estructural se encuentran los aminoglicósidos, los macrólidos y el cloramfenicol. En el caso de los aminoglicósidos, se han descrito tres tipos de enzimas: fosfotransferasas, acetiltransferasas y adenilil transferasas, de las cuales existen múltiples variantes. Estas enzimas añaden grupos fosfato, acetilo o adenilo, respectivamente, a los antibióticos, lo que les impide interactuar con sus moléculas diana. Las fosfotransferasas, codificadas por los genes *aphA* y *strAB*, afectan principalmente a kanamicina y estreptomina; las acetiltransferasas (genes *aacC*) inactivan gentamicina; mientras que las adenililtransferasas (genes *aadA*, *aadB*, etc.) inactivan estreptomina, espectinomicina y gentamicina.⁽¹⁶⁶⁾ Los genes *aadA* están ampliamente distribuidos en *S. enterica* de diversos orígenes y se encuentran tanto en el cromosoma como en plásmidos e integrones. Así lo demuestra un análisis realizado en octubre de 2018 con los 1,067 genomas de *S. enterica* de origen mexicano disponibles en NCBI, el 95.4% de las cepas portaba genes codificantes para adenililtransferasas.

Para los macrólidos, los genes que confieren resistencia mediante modificación enzimática incluyen *ereAB*, que afectan a eritromicina; así como *mphAB*, que inactivan eritromicina, azitromicina y claritromicina. La resistencia a estos antibióticos también puede estar mediada por genes que modifican su molécula diana. Por ejemplo, los genes *erm(30)*, *erm(31)*, etc., codifican enzimas modificadoras de la subunidad 23S del ribosoma, lo que impide la interacción de este con los macrólidos.⁽¹⁶⁶⁾

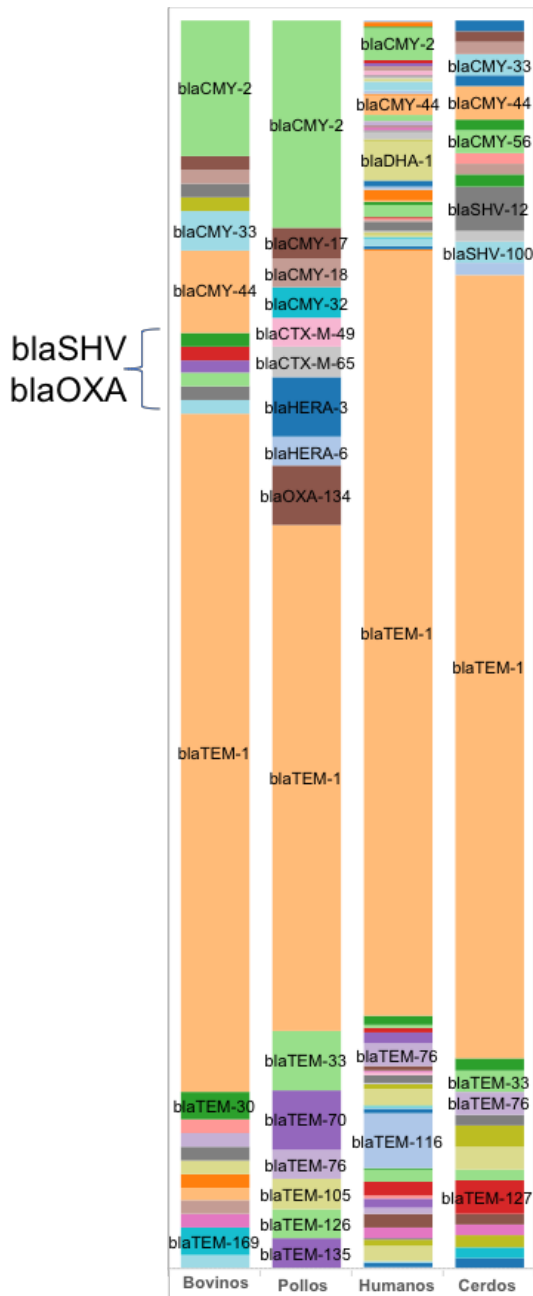


Figura 21. Distribución de genes codificantes de β -lactamasas presentes en cepas de *S. enterica* no tifoidea de bovinos (n=83), cerdos (n=113), pollos (n=42) y humanos (n=590) de varios países del mundo. Información tomada de Resistome Tracker, período 2013-2018.⁽¹⁶⁴⁾

La modificación de moléculas diana afecta también a otros antibióticos, como los inhibidores de la vía del folato. En este caso, genes como *sul1*, *sul2* y los *dfrABD*,

codifican enzimas modificadas (dihidropteroato y dihidrofolato reductasa, respectivamente), las cuales no tienen afinidad por las sulfas.⁽¹⁶⁶⁾

Por último, la activación de bombas de eflujo es otro mecanismo que utilizan las bacterias contra ciertos antimicrobianos. Este mecanismo afecta principalmente a tetraciclinas, anfenicoles y quinolonas. En tetraciclinas, los genes *tet(AB..Z)*, se asocian con la activación de bombas de eflujo de la familia MFS, descrita anteriormente. La misma función cumplen los genes *floR* y *cmlABV*, que confieren resistencia a cloramfenicol. Por tanto, la presencia de genes de resistencia contra uno solo de estos antibióticos podría conferir resistencia contra las dos clases, ya que ambos activan la misma familia de bombas de eflujo.

En quinolonas, los genes *oqxAB* activan bombas de eflujo de la familia RND,⁽¹⁶⁷⁾ lo que resulta mucho más preocupante, tomando en cuenta que las bombas RND son de amplio espectro y que estos genes suelen ser portados por plásmidos. Para las quinolonas existe otro mecanismo adicional, también codificado en plásmidos (genes *qnrAB*), cuyos productos son polipéptidos que mimetizan el ADN y protegen la ADN girasa de la inhibición causada por las quinolonas.⁽¹⁶⁸⁾ Como la inhibición que producen estos genes es de naturaleza competitiva, sólo aportan un bajo nivel de resistencia, que usualmente no se detecta en pruebas de susceptibilidad a antibióticos.⁽¹⁶⁹⁾ No obstante, la exposición de las cepas a concentraciones terapéuticas de quinolonas podría estimular la sobreexpresión de estos genes, conllevando a niveles de resistencia mucho más elevados. De hecho, existe evidencia experimental que relaciona la presencia de genes *qnrAB* con la emergencia de cepas de *Salmonella* resistentes a ciprofloxacino.^(170,171)

El programa ResFinder,⁽¹⁷²⁾ así como la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database),⁽¹⁶⁶⁾ se encuentran entre las herramientas bioinformáticas de libre acceso que permiten predecir el resistoma de varias especies bacterianas de interés clínico.

ARTÍCULO 1

PUBLICADO EN SCIENTIFIC REPORTS

DOI:10.1038/s41598-018-28169-4

Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*

Enrique Jesús Delgado-Suárez^{1,*}, Nelly Selem-Mojica², Rocío Ortíz-López³, Wondwossen A. Gebreyes⁴, Marc W. Allard⁵, Francisco Barona-Gómez^{2,*}, and María Salud Rubio-Lozano¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico

²Evolution of Metabolic Diversity Laboratory, Unidad de Genómica Avanzada (Langebio), Cinvestav-IPN, Irapuato, 36821, Mexico

³Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 66460, Mexico

⁴College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, Columbus, 43210, USA

⁵Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration, College Park, 20740, USA

*enriquedelgado.suarez@gmail.com; franciso.barona@cinvestav.mx

Nontyphoidal *Salmonella* (NTS) is a common pathogen in food-producing animals and a public health concern worldwide. Various NTS serovars may be present in apparently healthy animals. This could result in carcass contamination during the slaughter process leading to human exposure. While most genomic research has focused on *Salmonella* pathogenesis, little is known on the factors associated with subclinical infections and environmental persistence. We report here the widespread distribution of typhoidal toxin genes (i. e. the *cdtB* islet, *hlyE*, *taiA*), among NTS strains from a beef slaughter operation (n=39) and from epidemiologically unconnected ground beef (n=20). These genes were present in 76% of the strains, regardless of serovar, isolation source or geographical location. Moreover, strains that predominated in the slaughterhouse carry plasmid-borne type IV secretion systems (T4SS), which have been linked to persistent infections in numerous pathogens. Population

genomics supports clonal dissemination of NTS along the food production chain, highlighting its role as reservoir of genetic variability in the environment. Overall, the study provides a thorough characterization of serovar diversity and genomic features of beef-associated NTS in Mexico. Furthermore, it reveals how common genetic factors could partially explain the emergence and persistence of certain NTS serovars in the beef industry.

Introduction

Nontyphoidal salmonellosis is one of the leading causes of foodborne illness around the world⁽¹⁾. Moreover, its estimated cost reaches 3.3 billion US dollars per year in the United States of America (USA) alone⁽¹⁰⁾. Despite the application of control strategies, food-producing animals continue to be a significant contributor to disease burden in humans⁽³⁾. However, there is limited information on why certain *Salmonella* strains colonize the intestines of livestock without causing apparent illness in the host, creating a reservoir for human diseases⁽⁴³⁾. Hence, understanding the factors behind NTS resilience is of utmost importance from a public health perspective.

Extensive research with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium has revealed some virulence factors that are involved in the intestinal colonization of major livestock species⁽⁴⁾. However, comparative genomic analyses showed that there is considerable variation in virulence genes across serovars⁽⁵⁾. In spite of this, experimental evidence, particularly in beef-associated isolates, deals primarily with a small number of virulence genes, as well as epidemiological typing of isolates based on pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)^(6,7). Conversely, genome-wide analyses have not been fully explored, except for a limited number of studies focusing on locally-relevant serovars^(8,9). Therefore, our aim is to generate a virulence genomic profile and identify genetic differences that may be related with host adaptation and overall pathogenicity in NTS associated with beef cattle.

Here, we set up a long-term surveillance experimental scheme to conduct comparative genomics of bovine-associated *Salmonella* strains isolated from non-clinical sources along the beef production continuum in Mexico. We used a panel of 59 NTS isolates from previous studies conducted from March through November

2013 by our research group (Fig. 1). Our collection includes strains from multiple serovars and distant geographical regions within Mexico. We assessed their genetic diversity and conducted comparative genomics of virulence factors, stress response genes and plasmids, with the finding that most strains carry a conserved repertoire of virulence and stress response genes. Additionally, over 76% of isolates carry typhoidal toxins, while strains of the overrepresented *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo were the only ones carrying plasmid-borne T4SS. This study provides evidence of clonal dissemination of NTS along the food production chain, highlighting the significance of isolates colonizing apparently healthy animals, as reservoirs of genetic variability in the environment. Further research is needed to test whether the observed differences affect host adaptation and/or pathogen fitness under intensive beef cattle production settings.



Figure 1 | Number of NTS isolates collected by geographical location and step of the beef production continuum.

Results

Population genomic analysis shows clonal dissemination of NTS along the food production chain and limited intraserovar variation. *S. Montevideo* was overrepresented in the slaughterhouse (n=29), accounting for nearly 75% of the total number of isolates from faeces, carcasses, and beef cuts. Among ground beef

isolates, *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Give was the most frequently (8/20) found. Overall, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Montevideo, Give, and Muenster, accounted for more than 70% of the isolated strains.

According to genome annotation, isolates of the same serovar represent the same multi-locus sequence type (ST), except those of *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Give and Newport (see supplementary Table S1). The STs found in strains of *S. Newport* (ST118 and ST132) are the only ones that have been frequently associated with human infections⁽¹⁷³⁾. This is consistent with results of phylogenetic analysis (Fig. 2a), which broadly divided isolates into two genetically divergent sublineages with 100% bootstrap support. One sublineage was composed of *S. enterica* subsp. *enterica* serovars Reading, Newport, London, Bergen, Senftenberg and Derby isolates, which are relatively close to the classical virulent strains, represented by *S. Typhimurium* LT2 and *S. Typhi* CT18. The other sublineage includes over 76% of all isolates (45/59) from *S. Give*, *S. Montevideo*, *S. Muenster*, and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Roodepoort.

The phylogeny also shows isolates of the same serovar generally clustered together in well-supported clades, despite originating from different sources or sampling sites. For instance, isolates of *S. Montevideo* and *S. Muenster* from faeces, carcasses and cuts formed single clusters within each serovar, which demonstrates the faecal origin of these strains (Fig. 2a). Likewise, isolates of *S. Muenster* and *S. Give* formed closely related subclusters, despite originating from different sampling sites and/or sources. This pattern of genetic relatedness provides evidence of NTS dissemination along the beef production chain. At the same time, it raises the question of whether our bovine-associated isolates are any different from those isolated from other sources within Mexico.

To look into these possibilities in more detail, we selected representative isolates from each of our serovar subclusters, as well as additional isolates of the same serovar, from public databases, collected from produce, pet food, seafood, the environment, and clinical cases (n=47), to conduct further phylogenetic analyses (Fig. 2b). Two isolates of *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, which is highly adapted to

bovines, were also included in the analysis. We did not include isolates of *S. enterica* serovars Bergen and Roodepoort since no strains of these two serovars were available for comparison.

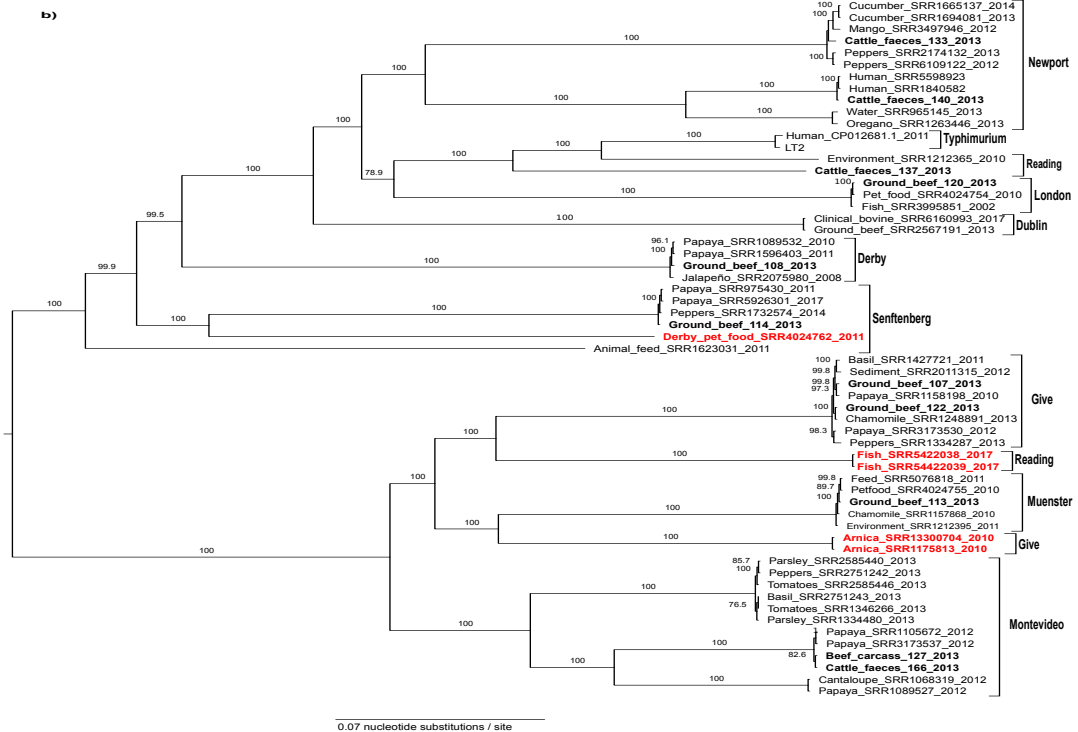
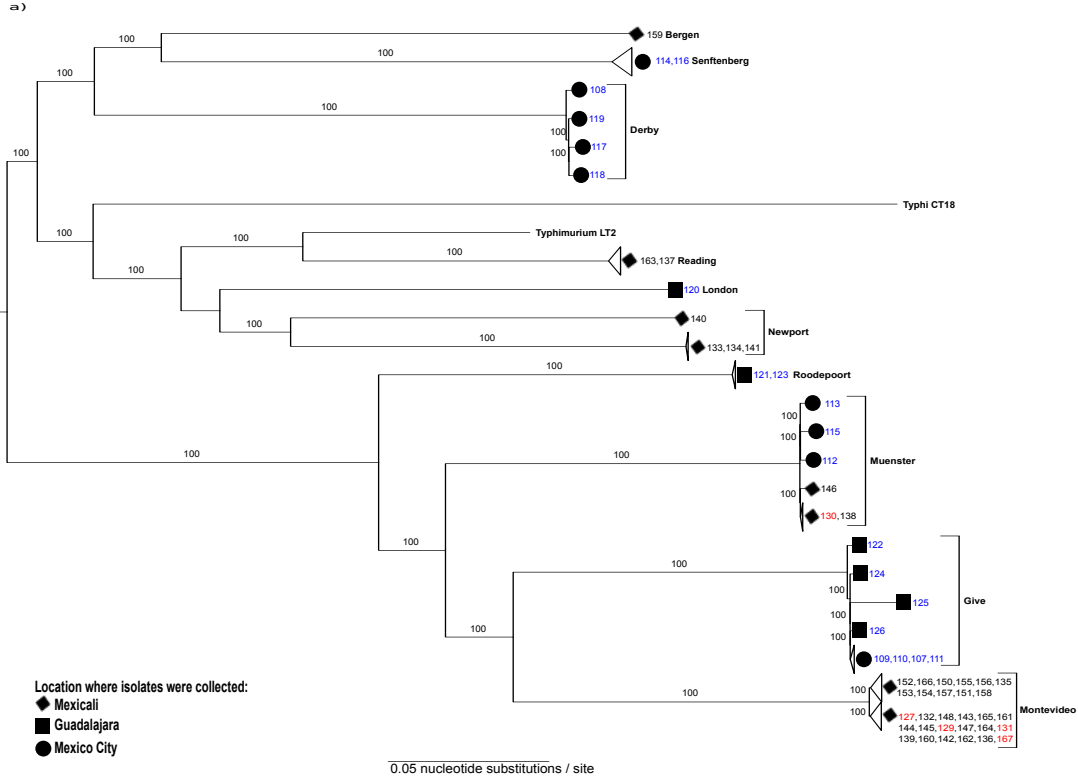


Figure 2 | Maximum likelihood (ML) midpoint-rooted tree based on SNP analysis of: a) 59 newly sequenced NTS strains, *Salmonella* Typhimurium LT2 and *Salmonella* Typhi CT18. Serovars are indicated in bold letters. Sample names are colour-coded according to isolation source (blue, ground beef; red, carcasses/cuts; black, faeces). The cities where isolates were collected are mapped onto the tree. The ML tree was generated in RAxML 7.7.1⁽¹⁷⁴⁾ under the GTR+ Γ model of nucleotide evolution, visualized using FigTree 1.4.3, and edited with Inkscape 0.91. The best tree was estimated by RAxML rapid bootstrapping (100 iterations) and subsequent ML search. Clade support is indicated above or next to each branch as bootstrap values, except when <70%.

b) 11 representative strains from this study, 47 additional isolates from produce, pet food, seafood, the environment, and clinical cases within Mexico, and 2 isolates of *Salmonella enterica* ser. Dublin. Isolation sources, NCBI accessions and/or sample names, and collection dates of isolates (if reported) are shown at tip labels. Isolates from this study are highlighted with bold letters. Serovars are mapped onto the tree. Isolates clustering with those of a different serovar are highlighted in red. *Salmonella* Typhimurium LT2 was used as a reference. The ML tree generation procedure and statistical support are the same as indicated in Fig. 2a.

The obtained phylogeny was very similar to that of bovine-associated isolates alone, albeit it showed a greater genetic diversity, as could be expected considering the wider range of NTS sources involved. Again, two well-supported divergent sublineages were identified, with one of them containing isolates (serovars Reading, London, Newport, Derby, and Senftenberg) that are closely related to virulent strains. There were two atypical *S. enterica* ser. Reading isolates that clustered in a different sublineage than their counterparts from bovine faeces and the environment. Likewise, two isolates of *S. Give* and one of *S. Derby* are closer to isolates of serovars Muenster and Senftenberg, respectively, than they are to their equivalents. The serovar of these atypical isolates was confirmed with SeqSero⁽¹⁷⁵⁾, providing evidence of intraserovar divergence in NTS from different environmental niches.

Interestingly, the analysis also showed our bovine-associated isolates are highly clonal with isolates from other sources. For instance, our *S. Montevideo* strains are very closely related to their counterparts isolated from papaya. Likewise, our isolates of *S. Derby*, *S. Give*, *S. Muenster*, *S. Senftenberg*, and *S. Newport* formed single clusters with those collected from produce, pet food, and the environment. In all serovar subclusters, there were isolates collected in different years. Moreover, our isolates of *S. Newport*, *S. London*, and *S. Reading* are genetically closer to strains that have been involved in human infections, as well as to strains of *S. Dublin*, which causes severe enteritis and systemic infections in cattle.

Taken together, these findings provide evidence of dissemination and persistence of NTS along the food production chain. To gain insights into the potential health risks and lifestyle dynamics allowing *S. enterica* serovars from bovine reservoirs to colonize humans, we then focused on functional traits that may be revealed after comparative genomics analyses.

Most strains have a conserved repertoire of virulence and stress response genes. Our strain collection showed limited variation in major virulence factors, stress response genes, and *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) 1 through 5. For instance, long polar fimbriae genes (*lpfABCDE*), which mediate selective adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine ileal Peyer's patches,⁽¹⁷⁶⁾ are present only in isolates of *S. Bergen* (1/1), *S. London* (1/1), *S. Newport* (4/4), *S. Reading* (2/2), and *S. Senftenberg* (2/2). Moreover, *sodCI*, a gene responsible for protecting the pathogen from the host oxidative burst⁽¹⁷⁷⁾, was present only in *S. Newport* isolates (4/4). The remaining strains (n=55) carried *sodCII*, which protects the cell from exogenous oxidative damage in the extracellular environment⁽¹⁷⁸⁾ and has <60% identity at amino acid level to *sodCI*.

Genes that were highly conserved ($\geq 90\%$ amino acid similarity) included type 1 (*fimACDFHIWYZ*) and thin aggregative (*csgABCEFG*) fimbrial operons, as well as non-fimbrial adhesion factors *misL* and *sinH*, which are required for intestinal colonization⁽¹¹⁹⁾. Conservation was also high (95-100% amino acid similarity) in

genes that take part in the activation and/or regulation of *Salmonella* invasion and intracellular survival mechanisms (*phoPQ*, *fur*, *mgtBC*, *rpoS*, *mig-14*), as well as iron acquisition (*iroN*, *fepA*, *fhuA*) and metabolism genes (*iroBCDE*, *fepBCDEG*, *fhuBCD*, *exbBD*, and *tonB*). The same was observed for stress response genes, which had 98-100% amino acid similarity across isolates. This included heat shock (*rpoH*), acid tolerance response (*rpoS*, *adA*), desiccation stress (*proP*) and fatty acid-associated osmo-tolerance (*fabAB*) genes. None of the isolates carried genes associated with highly virulent strains, such as those of the *Salmonella* virulence plasmid (*spvRABCD*, *pefABCD*, *rcK* and *mig-5*). However, all isolates carry *pagC*, which is 51% similar to *rcK* at protein level and confers serum resistance as well. A heatmap showing the virulence and stress response gene profile of the studied strains is presented in Fig. 3.

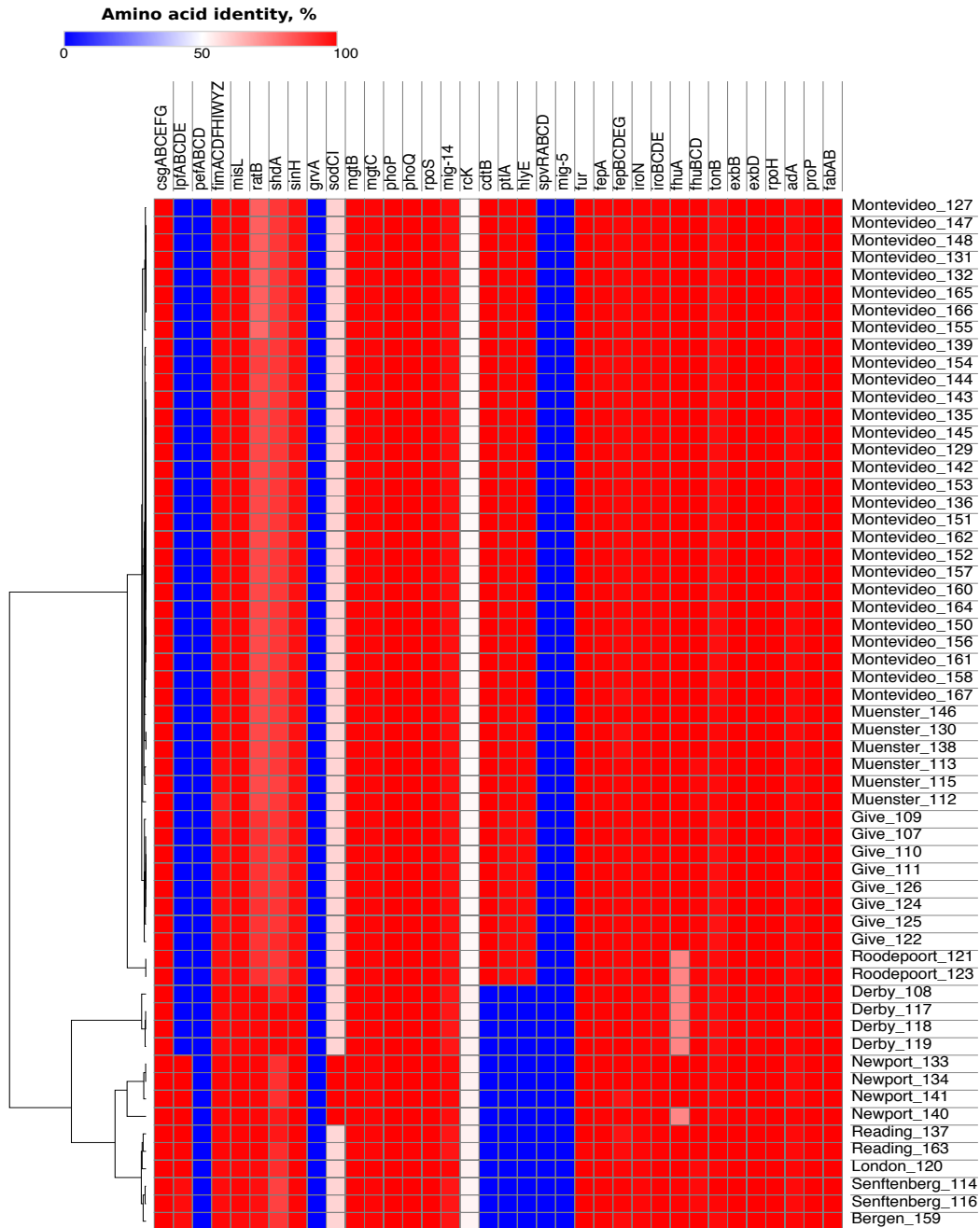


Figure 3 | Genomic profile of major virulence and stress response factors of 59 NTS strains of different serovars. Genes are colour coded in the heat map according to amino acid similarity to the reference proteins in the virulence factors database.⁽⁷³⁾ For stress response genes, *Salmonella* Typhimurium LT2 was used as a reference. The tree on the left side shows the clustering of isolates based on average Euclidean distance. Isolates are identified by serovar and short name. Refer to Table 2 and supplementary Table S4 for isolation source and accession numbers.

Regarding SPIs, their nucleotide and amino acid composition was very uniform within serovars. Hence, results are reported per serovar instead of per individual isolate. There were different versions of SPIs 1 and 3, with partial deletions close to the 5' region of both SPIs, as well as in the 3' region of SPI-1 (Fig. 4). Conversely, SPIs 2 and 4 were 100% conserved, while the 5' region of SPI-5 had a minor deletion in isolates of *S. Montevideo*, *S. Give*, *S. Muenster*, *S. Roodepoort* and *S. Senftenberg*, corresponding to small hypothetical proteins of unknown function.

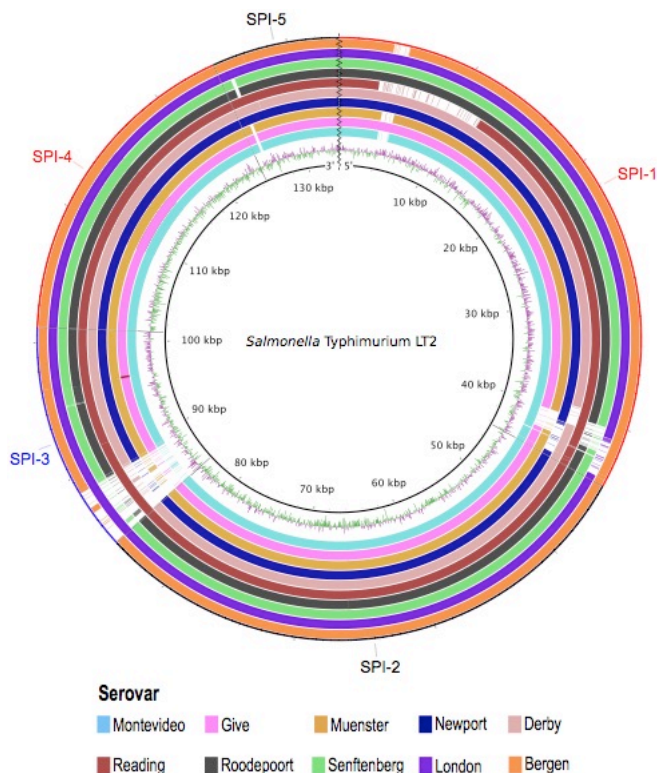


Figure 4 | Analysis of *Salmonella* SPIs 1 to 5. The inner black circle corresponds to the reference strain Typhimurium LT2, followed by GC skew $[(G-C)/(G+C)]$. Regions of GC content above average are drawn in green, whereas regions below average are in purple. The remaining slots represents (from inner to outer rings) serovars Montevideo (n=29), Give (n=8), Muenster (n=6), Newport (n=4), Derby (n=4), Reading, Roodepoort and Senftenberg (n=2 each), London and Bergen (n=1 each). Within each slot, the higher the colour intensity, the higher the nucleotide similarity to the reference strain.

To further characterize within-SPI variations, we conducted a sequence analysis of the encoded proteins of SPIs 1 and 3, identified in the newly sequenced isolates, against those of the LT2 reference strain. In SPI-1, the deletion on the 5' region corresponded to the type III secretion system (T3SS) effector gene *avrA*, which inhibits cell death during the first phase of the infection⁽¹⁷⁹⁾. Strains of *S. Montevideo*, *S. Muenster*, *S. Reading*, and *S. Bergen* lack this gene (see supplemental Fig. S1). In addition, the iron transporter encoding gene *sitD* was truncated (73 out of 282 amino acids) in *S. Reading* isolates, due to a premature stop codon. The truncated protein is still recognized as an ABC-type Mn^{2+}/Zn^{2+} transport system component through a conserved domain (CD) search against the CD database⁽¹⁸⁰⁾. However, further review of the structure of the reference protein (H9L416) in Uniprot showed the untranslated fragment contains the functional domain, as well as 6 out of 8 transmembrane-spanning regions. Therefore, most likely the truncated *sitD* gene is not encoding a fully functional protein. Isolates of *S. Reading* also had a large deletion (from *sprB* through *prgH*) that encodes several regulatory proteins and components of the T3SS apparatus. All other proteins were generally conserved, with an identity percentage $\geq 96\%$ across proteins and serovars. The 3' region of SPI-1, which had partial deletions in most strains, encodes hypothetical proteins of unknown function that are located beyond *invH*, the last gene of the invasion locus. Furthermore, the analysis of SPI-3 revealed that three genes of its 5' region (*sugR*, STM3754, and *rhum*) were deleted in all strains but those of *S. Reading*, *S. Senftenberg*, and *S. London* (supplemental Fig. S2). In their place, there were small insertions coding hypothetical proteins and transposases. The remaining proteins were highly conserved, with $>90\%$ amino acid similarity to those present in *Salmonella* Typhimurium LT2.

Widespread dissemination of highly conserved typhoidal toxins among NTS isolates from the predominant sublineage. Over 76% of isolates, encompassing *Montevideo*, *Give*, *Muenster*, and *Roodepoort* serovars, carry several toxin-encoding genes. Five of these genes are part of the *cdtB* islet (SPI-11), a recognized virulence

factor of *Salmonella* Typhi⁽¹⁰⁸⁾ that activates cells' DNA damage response, leading to cell-cycle arrest and eventually cell death by apoptosis. The key proteins encoded in this islet are PltA, PltB, and CdtB, which form the so called "typhoid toxin". Two additional typhoidal genes, which are harboured in SPI-18 of *Salmonella* Typhi CT18⁽¹²³⁾, were also detected in isolates carrying SPI-11. These included *hlyE*, encoding a pore-forming cytolysin, and *taiA* (*sty1499*), which encodes a Typhi-associated invasin. The genomic context of both SPI-11 and SPI-18 in the newly sequenced isolates is very similar to that of *Salmonella* Typhi CT18 (see supplementary Fig. S3 and Fig. S4).

Both SPIs (11 and 18) have been reported previously in a limited number of NTS strains.^(181,182) Since SPIs are thought to be associated with niche specialization, we conducted a broader phylogenetic analysis with isolates of diverse serovars, sources and regions around the world. These included strains from this study carrying SPIs 11 and 18 (n=45), as well as another 63 publicly available isolates from four different continents (Fig. 5). The criteria used for the inclusion of isolates in the analysis are described in the methods section.

Results show SPIs 11 and 18 are highly conserved across both typhoidal and NTS isolates of different sources and countries, as indicated by the lower posterior probabilities supporting *S. enterica* subsp. *enterica* subclades. Divergence was only observed in strains of subsp. *diarizonae* and the *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka strain, isolated from a pond in the United States. Hence, there is no signal pointing at the modification of these genes in NTS as an adaptive response to any particular host or niche. However, their broad conservation and the low number of amino acid substitutions per site suggest fitness advantages associated with these features exceed fitness costs.

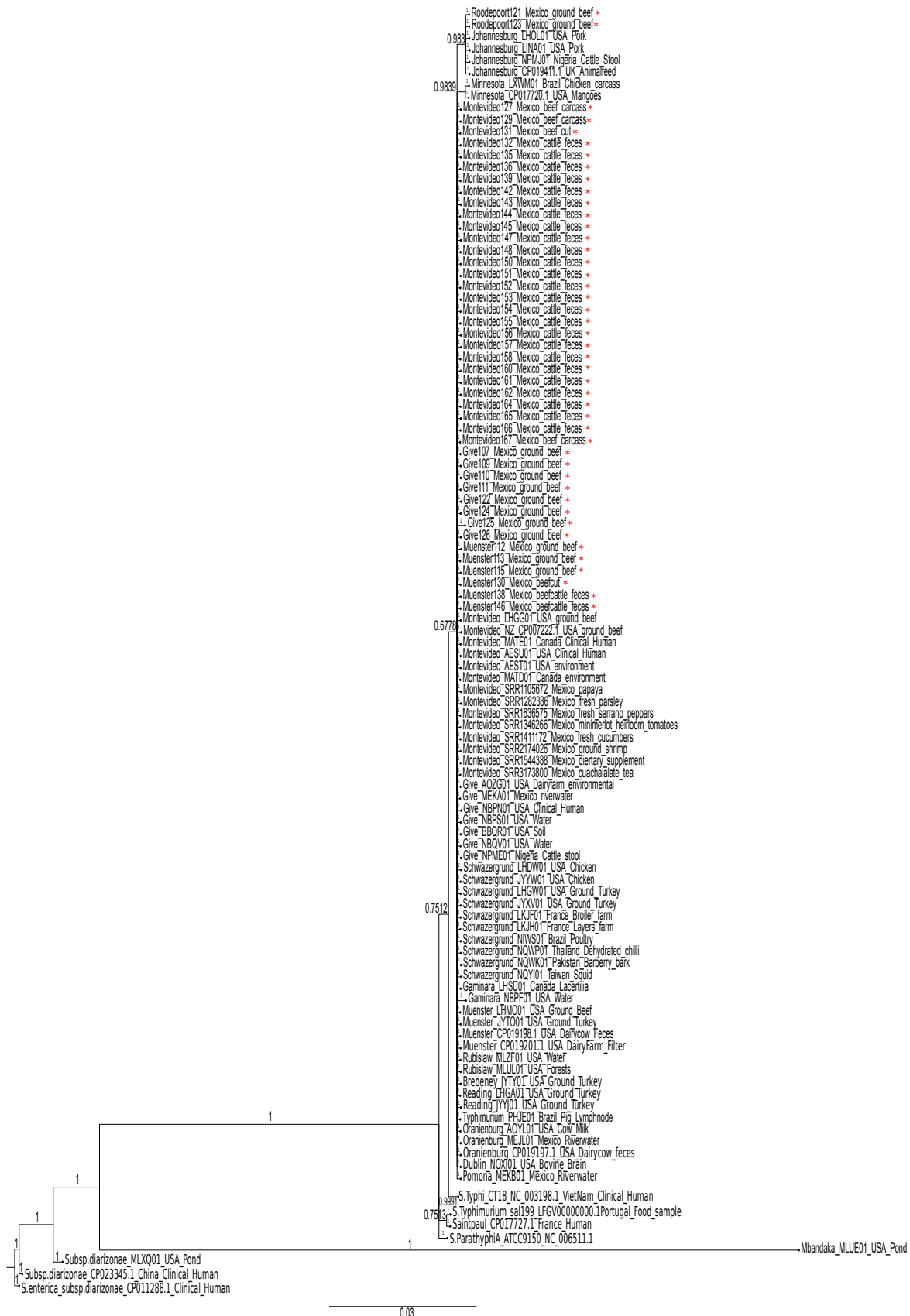


Figure 5 | Concatenated phylogenetic analysis of CdtB, PltA, and HlyE of 59 NTS strains of different serovars and another 63 isolates available at NCBI. Posterior probabilities are indicated close to each branch. Serovar, sample name and/or accession, source, and geographical location of isolates are indicated at tip level. Samples from this study are highlighted with an asterisk. The scale indicates the number of amino acid substitutions per site. Analysis conducted with MrBayes 3.2.6⁽¹⁸³⁾ in 1 million generations. For accession numbers of strains see supplementary Table S4.

The identified plasmids carry resistance genes, class-1 integrons, and T4SS.

Overall, most plasmids encode resistance genes to both antimicrobials and heavy metals, and therefore we proceeded to investigate if these were the result of selective pressures in our system using comparative genomics. We detected replicons from eight different plasmids across strains (Table 1). The full report of plasmid prediction statistics is provided as supplementary information (Table S2). Likewise, the alignment of each reference plasmid to the newly sequenced isolates is provided in supplemental Fig. S5 through S11.

The R478 (IncHI2A) plasmid, predicted in *S. Give* strains, encodes chloramphenicol (*cat*), tetracycline (*tetA*) and aminoglycoside (*aphA*) resistance genes, as well as copper (*copE2ABDRSE1*), tellurium (*terY3Y2XY1W*, *terZABCDEF*), mercury (*merEDACPTR*) and silver (*silESRCBAP*) resistance gene operons. Likewise, the pK245 plasmid of *S. Muenster* strains carry a class-1 integron (1014 bp), which harbours both aminoglycoside (*aacC2*) and sulphonamide (*dfra14*) resistance gene cassettes. Furthermore, the pRSF1010-SL1344 (IncQ1) plasmid, predicted in the *S. London* strain, encodes aminoglycoside (*strB*, *aph(3'')-Ib*) and sulphonamide (*sul2*) resistance genes; while R27 (IncHI1A), predicted in one *S. Give* strain, encodes resistance factors against tetracycline (*tetA*), magnesium and cobalt (*corA*), as well as ultraviolet light (*mucAB*). Interestingly, although the pNDM-KN (IncA/C2) and pK245 (IncR) plasmids encode class-1 integrons and resistance genes against multiple drugs (i.e. extended spectrum beta lactams, sulphonamides,

chloramphenicol and macrolides), these genes were not found in the newly sequenced isolates carrying replicons of these two plasmids.

Table 1. General features and accession numbers of the candidate plasmids identified with PlasmidFinder¹ per *Salmonella* serovar

Plasmid profile	Incompatibility group	Size, bp	#ORFs	Accession	Serovar (n, %) ²
pOLA52	IncX1	51,602	68	EU370913	Montevideo (18, 62)
pIGJC156	--	5,146	3	NC-009781	Montevideo (14, 48)
IncFII(p96A)	IncFII	67,727	102	JQ418521	Montevideo (11, 38)
pK245	IncR	98,264	90	DQ449578	Muenster (6, 100)
					Senftenberg (2, 100)
pNDM-KN	IncA/C2	162,746	137	JN157804	Give (7, 88)
					Reading (2, 100)
R478	IncHI2A	274,762	295	BX664015	Give (7, 88)
pRSF1010_SL134	IncQ1	8,688	12	HE654726	London (1, 100)
4					
R27	IncHI1A	180,461	207	AF250878	Give (1, 13)

¹PlasmidFinder 1.3⁽¹⁵⁹⁾. Results based on raw reads and an identity threshold of 95%.

²Number and percentage of isolates of the same serovar carrying the candidate plasmids.

Predicted plasmids also divided *S. Montevideo* isolates into two groups, one that carried pOLA52 (n=18) and the other IncFII(p96A) (n=11). Most of the pOLA52-carrying isolates (n=14) also had the small pIGJC156 plasmid, which only carries three plasmid replication-related genes. Interestingly, both IncFII(p96A) and pOLA52-carrying isolates had genes encoding a type IVA (VirB/D4) T4SS, which is known to fulfil the translocation of both DNA and effector molecules and is associated with persistent infections in numerous pathogens⁽⁸²⁾. This feature was not present in

strains of other serovars from the slaughterhouse. Considering *S. Montevideo* was overrepresented in this location, and the fact that the T4SS was putatively carried in plasmids, we reasoned T4SS might be associated with fitness advantages in that niche.

To test this hypothesis, we conducted a sequence analysis among a selected group of 86 additional *S. Montevideo* strains publicly available and originally isolated in Mexico, USA and Canada from a variety of foods, clinical cases, and the environment (accession numbers provided in Table S3). For that purpose, we used the amino acid sequences of each of the T4SS components of one of our strains (SRR3479678) as sequence queries. Strikingly, T4SS components are uncommonly found in only 2/86 isolates: one from an unknown source (WGS project accession AFCS01) and one isolated from ground beef (WGS project accession LHGG01). This observation suggests a variable and possibly niche-related distribution of T4SS in *S. Montevideo*. Moreover, the co-occurrence of T4SS and toxin/antitoxin systems (i. e. *ccdAB*, *stbED*) observed in pOLA52 and IncFII(p96A) plasmids likely ensures all the progeny inherits the plasmid, stabilizing its fitness. In addition, the pOLA52 plasmid carries resistance genes against betalactams (*bla*-TEM) and quinolones (*oqxAB*), which could further contribute to the improved fitness of strains if subjected to selective pressure. Overall, these results emphasise the need of further research to gain insights into the actual contribution of VirB/D4 plasmids to fitness advantages in feedlot cattle.

Discussion

In this study, we conducted comparative genomics of 59 NTS isolates of 10 different serovars collected along the beef production chain across nine months in different regions of Mexico. Interestingly, *S. Typhimurium*, which is commonly found in beef-associated isolates worldwide⁽³¹⁾, was not detected here. Nevertheless, the distribution of NTS serovars is often irregular across time, studies and regions. For instance, *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Meleagridis, Anatum, Agona, and Typhimurium, were among the top 10 most common NTS serovars isolated from retail beef in four states of Mexico in 2002-2005⁽³⁸⁾. More recently, some of the serovars

we found (i.e. Montevideo, Muenster, Give, and Reading) but not Typhimurium have been reported in bovine-associated samples^(39,49). It is worth noting, however, that the overrepresentation of *S. Montevideo* we observed is consistent with the increasing prevalence of this serovar among healthy cattle in North America^(36,54). Moreover, our *S. Montevideo* strains were isolated from feedlot cattle, which is managed similarly across Canada, Mexico, and the United States. Interestingly, all NTS serovars studied here have been implicated in human clinical cases in Mexico, according to a historical paper of epidemiological data (1972-1999)⁽³⁷⁾. Therefore, the significance of non-clinical isolates as reservoirs for human infections should not be minimized.

The SNP-based phylogeny shows NTS disseminates up to retail level and across distant geographical regions and ecological niches within Mexico. These findings highlight the significance of beef cattle as a reservoir of NTS, especially when the pathogen successfully establishes itself in apparently healthy animals that are approved for slaughter. Recent studies have demonstrated that the physiological stress associated with pre-slaughter handling and transport of livestock increases *Salmonella* faecal shedding^(97,98). Moreover, Ginocchio et al.⁽⁸⁸⁾ suggested intensive animal production could create a high probability of a continual faecal-oral infection cycle, whereby the pathogen may not require to enter cells of the intestinal epithelium for its successful replication. In this instance, key metabolic activities that are essential for acute salmonellosis might be dispensable during persistent infections, as previously suggested⁽¹⁰¹⁾. Likewise, studies in a mouse model showed less invasive NTS strains are excreted at higher concentrations in the faeces⁽⁸⁶⁾. This could be a key driver governing the relative representation of NTS serovars in certain geographical regions. Such hypothesis is supported by a recent study⁽⁹⁹⁾ that suggests the emergence of a cattle-associated subtype of *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Cerro in the United States to be associated with subclinical infections and thus, the lack of control measures to contain its spread.

Regarding the virulence genomic profile, most isolates seem to have a conserved virulence machinery. In general, however, isolates that were genotypically closer to *S. Typhimurium*, such as those of *S. Newport*, are the only ones harbouring genes

associated with more virulent phenotypes (i. e. *lpfABCDE*, *sodCI*)^(176,177). This is consistent with the phylogenetic analysis, showing strains of *S. Newport* are closely related to those of *S. Typhimurium* and *S. Newport* implicated in human infections in Mexico.

Salmonella pathogenicity islands are essential for virulence expression across livestock species⁽¹²¹⁾. The different versions of SPIs 1 and 3 observed in some isolates are consistent with previous research documenting both SPIs remain unstable in some *Salmonella* environmental strains. For instance, different studies have reported absence of some genes (i.e. *hilA*)⁽⁷⁾, as well as large deletions of entire loci (i. e. *inv*, *hil*, *spa*)⁽⁸⁸⁾ in SPI-1 of various *S. enterica* subsp. *enterica* serovars. This is in line with the massive deletion of SPI-1 genes we observed in *S. Reading* isolates. Likewise, the deletion of the T3SS effector *avrA* has been frequently reported in less virulent strains^(70,86). Along the same lines, the proteins encoded in the 5' region of SPI-3 have not been linked to virulent phenotypes and thus, these genes are thought to be subjected to negative selective pressure,⁽¹⁸⁴⁾ leading to their eventual deletion. Moreover, it has been suggested that the instability of this region could be associated with its proximity to the insertion site of SPI-3 (*tRNA-se/C*), which is likely a hot spot for foreign DNA integration⁽¹²¹⁾.

It is difficult to pinpoint if the observed differences in SPIs would result in attenuated virulent phenotypes in bovines. As shown here, despite lacking part of the T3SS apparatus, *S. Reading* isolates were still present in cattle faeces. SPI-4, which was 100% conserved in all isolates, has been shown to play a major role in bovine intestinal colonization⁽¹⁸⁵⁾. Conversely, it has been demonstrated that disruption of several genes of SPIs 1, 2 and 3 do not affect colonization of chicken, pigs, and cattle, probably due to the functional redundancy in several *Salmonella* metabolic pathways⁽⁴⁾. In this regard, for instance, both *avrA* and *sopB* inhibit cell death during the first phase of the infection⁽¹⁷⁹⁾. Likewise, since iron acquisition is essential for survival and pathogenesis of most bacteria, they usually carry multiple iron acquisition and metabolism genes. As observed here, strains of *S. Reading* have a truncated *sitD* gene, which encodes an iron transporter. This modification has not been reported

before, to the best of our knowledge. However, these isolates carry a highly conserved repertoire of other iron acquisition and metabolism genes (*iroBCDE*, *fepBCDEG*, *fhuBCD*, *exbBD*, and *tonB*) that may compensate the lack of a functional SitD.

The typhoidal toxin genes that were widely distributed in our isolates have been reported previously in few NTS serovars^(181,186). Among them, the *cdtB* islet has received most attention since its functionality in NTS could improve our understanding of typhoid fever pathogenesis, where the typhoid toxin is thought to play a central role⁽¹⁰⁷⁾. However, literature findings regarding the function of the typhoid toxin in NTS are not conclusive. On one hand, several *in vitro* studies have demonstrated the cytotoxicity phenotype of NTS isolates carrying the *cdtB* islet^(115,116). Therefore, these authors conclude CdtB produced by NTS appears to play an important role in pathogenesis. On the other hand, the typhoid toxin has been shown to favour host survival and long-term infections in a mouse model⁽¹¹⁷⁾. Likewise, research showed *cdtB*-positive NTS strains of *S. Montevideo* and *S. Schwarzgrund*, accounted for invasive disease in humans,⁽¹¹⁸⁾ showed lower invasiveness and did not cause mortality in intraperitoneally infected mice as compared to *cdtB*-negative virulent strains (i.e. *S. enterica* ser. Dublin, Cholerasuis, Typhimurium, and Enteritidis).

Although phylogenetic analysis did not support these toxin genes are source-associated, their widespread distribution in non-clinical isolates of bovine origin is intriguing. Possibly, these genes are not expressed in NTS adapted to an extracellular lifestyle, as commented before⁽¹⁰¹⁾. However, their high conservation across NTS serovars of multiple sources indicates they should be relevant for pathogen survival and/or for the interaction with host cells. Otherwise, these horizontally-acquired regions would have been progressively degraded or deleted from the genome. Undoubtedly, further research is needed to further understand the function of typhoidal toxins in NTS, as well as to test if they provide fitness advantages in certain hosts or livestock production settings.

Plasmids, another factor that contribute to environmental fitness in bacteria⁽¹⁸⁷⁾, are particularly prone to have a bearing at the population level. Interestingly, the strains

with a wider geographical distribution (*S. Give* and *S. Muenster*) were predicted to carry resistance plasmids that contributed antimicrobial and heavy metal resistance genes. This could also represent fitness advantages under intensive beef production, where the use of high rates of mineral supplementation is commonly practiced⁽¹⁸⁸⁾. For instance, recent research has shown the occurrence of a transferable copper resistance gene (*tcrB*) in faecal enterococci is higher (~10x) in feedlot cattle fed copper-supplemented diets (100 mg/kg of feed) as compared to those fed normal copper levels (10 mg/kg of feed)⁽¹⁸⁹⁾. Likewise, Zhou et al.⁽¹⁹⁰⁾ observed the use of copper and zinc supplementation in the diet of dairy cattle was related with the abundance of metal resistance genes ($r=0.69$, $p<0.01$) and antibiotic resistance genes ($r=0.62$, $p<0.01$) in gut bacteria. This evidence highlights the importance of avoiding excessive livestock mineral supplementation, which may indirectly contribute to pathogen persistence in the host and/or the environment.

Along the same lines, it is interesting to note that the presence of T4SS is associated with persistent infections in numerous pathogens⁽⁸²⁾. Based on this observation, we speculated that the presence of T4SS, exclusively in *S. Montevideo* isolates, might have contributed to the overrepresentation of this serovar among slaughterhouse samples. This hypothesis is supported by recent *in vitro* studies showing strains of *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Heidelberg carrying a plasmid-borne T4SS down regulate host innate immune response, which allows a higher invasion rate as compared to T3SS-mediated invasion⁽⁸³⁾. Conversely, studies with strains of the same serovar in a *Caenorhabditis elegans* model⁽¹²⁶⁾, showed T4SS were associated with a greater pathogenic potential. To the best of our knowledge, there are no previous reports of VirB/D4 plasmids in *S. Montevideo*.

Overall, this study provides evidence of clonal dissemination and persistence of NTS, originated from apparently healthy animals, along the food production chain. Most of these strains carry a conserved repertoire of virulence factors, which poses a food safety risk to consumers. Moreover, comparative genomic analyses show non-clinical NTS isolates may act as reservoirs of genetic variability in the environment, influencing the organism's characteristics as a foodborne pathogen. Further research

is needed for a better understanding of the evolution and survival of bovine-associated *Salmonella*, especially at the pre-harvest phase, with emphasis in the features that are widely distributed in the population and may contribute to host adaptation and persistence.

Methods

Bacterial strains. We used a panel of 59 NTS isolates collected during previous studies, which were part of two different master's theses, conducted in 2013 by our research group (Fig. 1). In one of the studies, we isolated 39 NTS strains from beef cattle rectal contents (34/100), carcass swabs (3/100), and primal cut swabs (2/100) from a commercial beef slaughter operation located in northern Mexico⁽¹⁹¹⁾. We also included a group of unrelated strains, isolated from retail ground beef (20/150) during the second master's thesis project⁽⁶¹⁾. These isolates were collected from retailers located in Mexico City and Guadalajara, more than 2,000 km away from the northern slaughterhouse. Hence, our study included isolates collected along the beef production continuum and from distant geographical locations, providing the basis for studying their genetic diversity, as well as the potential role of genetic determinants in the relative representation and dissemination of specific strains.

All strains were isolated from different carcasses, cuts or ground meat packages across a 9-month period (Table 2). They were also confirmed by conventional biochemical tests (triple sugar iron, sulfhydrylic acid-indole motility, Simmons citrate, urease, methyl red/Voges-Proskauer, malonate-phenylalanine, and gluconate) and polymerase chain reaction targeting the *invA* gene⁽¹⁹²⁾. Pure isolates were preserved long term (about 1 year) at -80°C in vials containing a 50% glycerol solution. Bacteria were recovered from the glycerol stock by streaking onto tubes containing semi-solid trypticase soy agar. Subsequently, the tubes were shipped to the molecular biology laboratory of the Center for Food Safety and Applied Nutrition (Food and Drug Administration, Maryland, USA) for WGS. The input material for WGS was a cell pellet of a 1 mL bacterial culture grown in Luria Bertani broth at 37°C overnight.

Table 2. Total number of isolates collected by *Salmonella* serovar, and number of isolates by isolation source, geographical location, and collection date

<i>Salmonella</i> serovar ¹	n	Isolation source	Geographical location	Collection date
Montevideo	29			
	1	Carcass	Mexicali	09/20/2013
	1	Carcass	Mexicali	09/23/2013
	1	Carcass	Mexicali	09/25/2013
	1	Faeces	Mexicali	09/21/2013
	14	Faeces	Mexicali	09/27/2013
	1	Carcass	Mexicali	09/27/2013
Give	10	Faeces	Mexicali	09/21/2013
	8			
	4	Ground beef	Mexico City	04/28/2013
Muenster	4	Ground beef	Guadalajara	09/16/2013
	6			
	1	Primal cut	Mexicali	09/25/2013
	2	Faeces	Mexicali	09/27/2013
	2	Ground beef	Mexico City	03/04/2013
Newport	1	Ground beef	Mexico City	11/04/2013
	4			
	2	Faeces	Mexicali	09/21/2013
Derby	2	Faeces	Mexicali	09/27/2013
	4			
	1	Ground beef	Mexico City	04/28/2013
	2	Ground beef	Mexico City	03/04/2013
Reading	1	Ground beef	Mexico City	04/18/2013
	2	Faeces	Mexicali	09/27/2013
	2	Ground beef	Guadalajara	09/16/2013
Senftenberg	2			
	1	Ground beef	Mexico City	11/04/2013
	1	Ground beef	Mexico City	04/18/2013
Bergen	1	Faeces	Mexicali	09/27/2013
London	1	Ground beef	Guadalajara	09/16/2013

¹Predicted with SeqSero software⁽¹⁷⁵⁾.

Whole genome sequencing and serovar prediction. Genomic DNA was extracted with the fully automated Qiagen QIAAsymphony system using the QIAAsymphony DSP DNA Kit. Next, we quantitated the extracted DNA by Qubit Fluorometric Quantitation (LifeTechnologies), per the manufacturer's instructions. Finally, DNA libraries were prepared from 1 ng of genomic DNA using the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit v.2 (Illumina) and sequenced on the Illumina MiSeq system (paired-end 2 x 250

bp reads). Raw sequences were deposited at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) web site and are also available at the Enterobase web server.

For serovar prediction, we conducted *in silico* analysis using raw reads with the SeqSero software⁽¹⁷⁵⁾. There were isolates where the predicted antigenic profile was incomplete. In these cases, the serovar was estimated by checking that of the closest organisms in the *Salmonella* SNP tree from the NCBI pathogen detection isolates browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/search>). The accessions numbers, strains' metadata, and the predicted serovars and antigenic profiles are listed in supplementary Table S4.

Before genome assembly, the quality of raw reads was assessed with the FastQC software⁽¹⁹³⁾. Next, we used Trimmomatic⁽¹⁹⁴⁾ for removing Illumina adaptors and filter reads according to quality criteria. The trimmed sequences were then re-run in the FastQC software to make sure only high-quality sequences (i.e. quality scores ≥ 30) were used for genome assembly.

Genome assembly and annotation. Trimmed sequences were *de novo* assembled in the PATRIC web server⁽¹⁹⁵⁾ using the SPAdes assembly algorithm⁽¹⁹⁶⁾. Genome annotation was performed in the RAST server in September 2016^(197,198). The analysis was set up to correct automatically errors and frameshifts. The assembled genomes had 28-109 contigs, an average depth of coverage that ranged from 24 to 268x (median 94x) across strains, while the median N50 and L50 values were 390,205 bp and 5, respectively. Moreover, genome annotation showed G+C content (around 52%) and gene density (about 1000 genes/Mb) were comparable across strains. The full report of assembly and annotation statistics is provided as supplementary information (Table S1).

Genetic relatedness among the newly sequenced NTS. The genetic diversity of NTS strains was assessed through SNP phylogeny. First, SNPs were called, filtered, and validated through CSI Phylogeny 1.4⁽¹⁹⁹⁾. The resulting concatenated alignment

was then used to generate a ML tree in RAxML 7.7.1⁽¹⁷⁴⁾ under the GTR+ Γ model of nucleotide evolution at the CIPRES web server⁽²⁰⁰⁾. The best tree was estimated by RAxML rapid bootstrapping (100 iterations) and subsequent ML search. The resulting tree was visualized in FigTree 1.4.3, and edited with Inkscape 0.91. The same methodology was used for the phylogenetic analysis that included 47 additional isolates from different sources within Mexico. These isolates are publicly available and were collected from produce, pet food, seafood, the environment, and clinical cases (Fig. 2). Two isolates of *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Dublin, which is highly adapted to bovines, were also included in the analysis. We did not include isolates of *S. Bergen* and *S. Roodepoort* since no strains of these two serovars were available for comparison.

Virulence and stress response genomic profile of sequenced isolates.

Annotated genomes were screened for the presence of major *Salmonella* virulence factors (adherence, antivirulence, magnesium uptake, regulation, resistance to antimicrobial peptides, serum resistance, stress protein, toxins, and macrophage-inducible gene-5), as reported in the virulence factors data base⁽⁷³⁾.

Stress response genes were also analysed, using *Salmonella* Typhimurium LT2 as a reference. This included genes related to heat shock (*rpoH*), acid tolerance response (*rpoS*, *adA*), desiccation stress (*proP*), and fatty acid-associated osmo-tolerance (*fabAB*). The amino acid sequence of each reference protein was BLAST-searched against the annotated genome of each strain, with a maximum e-value threshold of 10^{-30} at the RAST web server⁽²⁰¹⁾. Matching protein sequences were mapped back to their corresponding genes in The Seed Viewer. The resulting amino acid identity percentage was used to build a heatmap, showing the virulence and phylogenetic profiles of the strains, with the aid of MORPHEUS software (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

For ambiguous annotations and amino acid identities below 90%, a Psi-Blast analysis was performed from within The Seed Viewer, to corroborate the matching protein was a homologue of the reference protein. Furthermore, when missing proteins were

found, the absence of the corresponding genes was verified by comparing reference genes against the raw reads of the involved isolate with the Artemis Comparison Tool⁽²⁰²⁾. Variation within SPIs was also assessed. For that purpose, we collected the nucleotide and protein sequences of SPIs 1 through 5 of *Salmonella* Typhimurium LT2 from the Pathogenicity Island Database⁽¹¹⁹⁾. Next, we prepared a multi-FASTA file with the reference sequences, which was used in the BLAST Ring Image Generator Software, version 0.95⁽²⁰³⁾, against the assembled genomes to produce the corresponding BLAST atlas. We used the LT2 strain as a reference for it has been widely characterized and its whole genome is available at NCBI. For those SPIs showing variation across strains, their reference protein sequences were compared to those of our genomes at the GView web server⁽¹²⁴⁾, with the following configuration: expect e-value cutoff=0.001, genetic code=bacterial and plant plastid, alignment length cutoff=50, percent identity cutoff=70 and tblastx as the BLAST program. Moreover, we conducted a conserved domain (CD) search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) to analyse if the truncated SitD of *S. enterica* ser. Reading isolates still matched an ABC-type Mn²⁺/Zn²⁺ transport system component. Since it did, we then analysed the reference protein (H9L416) structure at Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) to check if the untranslated fragment contains regions that are required for a fully functional protein.

Finally, since the virulence profile showed a widespread dissemination of SPIs 11 and 18 among strains of the major sublineage, we also used the concatenated amino acid sequences of representative genes from both SPIs for phylogenetic reconstruction, including 63 additional isolates publicly available at NCBI (Fig. 5). The criteria used for the inclusion of isolates in this analysis were: 1) strains that are positive for both SPI-11 and SPI-18, 2) either complete genomes or draft genomes with full genome representation in its final version, 3) depth of coverage of at least 30x, and 4) genes from both SPIs should be annotated in the genome. Since *pltB* and *taiA* were not annotated in many isolates, we decided to conduct the phylogenetic analysis with the two biggest proteins of SPI-11 (CdtB and PltA), and HlyE from SPI-18. We also included representative virulent strains (Typhi CT18, Paratyphi A, and

Typhimurium sal199), as well as three strains of *S. enterica* subsp. *diarizonae* (CP011288.1, CP023345.1, and MLXQ00000000.1).

The concatenated sequences of CdtB, PltA, and HlyE were aligned in Seaview⁽²⁰⁴⁾ through ClustalO⁽²⁰⁵⁾ and curated with Gblocks⁽²⁰⁶⁾. The resulting Nexus file was used to construct a phylogenetic tree using MrBayes 3.2.6⁽¹⁸³⁾ with the following parameters: aamodelpr=mixed, samplefreq=100, burnfrac=0.25 in four chains and for 1 million generations. The output tree was edited with InkScape 0.91 software (<https://inkscape.org/es/>).

***In silico* plasmid prediction.** First, plasmids were predicted with the aid of PlasmidFinder 1.3⁽¹⁵⁹⁾. The analysis was carried out with the raw reads at the Center for Genomic Epidemiology web server using a threshold identity of 95%. When plasmid replicons were detected, these were considered candidate plasmids. Accordingly, we used the accession numbers of the prediction output to collect their complete nucleotide sequence from NCBI for further confirmation. Afterwards, we aligned the nucleotide sequence of each reference plasmid against the assembled genomes at the GView web server⁽¹²⁴⁾. The candidate plasmids were confirmed based on the identification of consecutive genes that were homologous between contigs and plasmids. If most of the candidate plasmid ($\geq 70\%$) was covered in the assembled genome, it was considered as a putative plasmid. Finally, we used the average depth of coverage to verify the above prediction. Usually, plasmid-associated contigs have very similar or the same read depth, which is also higher than those of chromosomal contigs (except for multi-copy ribosomal genes).

We used this procedure since draft genomes contain both chromosomal and plasmid DNA. However, we acknowledge conducting *in silico* plasmid predictions with these data is cumbersome and not fully reliable. The plasmids may be scattered in multiple contigs or some of their fragments might be lost in the gaps. Additionally, low-copy plasmids may be overlooked due to its similar depth of coverage in relation to chromosomal DNA. Hence, these should be considered putative results until the predicted plasmids are closed.

Data Availability

The data sets analysed during the current study are available in the NCBI repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>). The accession numbers are provided either in Table 2 (for our own isolates) or in the methods section (for additional publicly available genomes that were included in some comparative genomic analyses). Furthermore, our isolates are also available in the Enterobase repository (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>) with the accession numbers provided in Table 2. Likewise, data generated during this study are either included in this published article (and its Supplementary Information files) or are available from the corresponding author on reasonable request.

REFERENCES

- 1 Organización Mundial de la Salud. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015, <http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/> (2015).
- 2 Hoffmann, S., Batz, M. B. & Morris, J. G., Jr. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot* 75, 1292-1302, doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-417 (2012).
- 3 Loudon, B. C., Haarmann, D., Han, J., Foley, S. L. & Lynne, A. M. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food animals in the U.S. *Food Research International* 45, 968-972, doi:10.1016/j.foodres.2011.03.055 (2012).
- 4 Rodriguez-Rivera, L. D. et al. Subtype analysis of *Salmonella* isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human- and bovine-associated subtypes. *Vet Microbiol* 170, 307-316, doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.013 (2014).
- 5 Chaudhuri, R. R. et al. Comprehensive assignment of roles for *Salmonella typhimurium* genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genet* 9, e1003456, doi:10.1371/journal.pgen.1003456 (2013).
- 6 Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W. & Friis, C. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microbial ecology* 62, 487-504, doi:10.1007/s00248-011-9880-1 (2011).
- 7 Ayala, D., Nightingale, K., Narvaez-Bravo, C. & Brashears, M. M. Molecular Characterization of *Salmonella* from Beef Carcasses and Fecal Samples from an Integrated Feedlot and Abattoir in Mexico. *J Food Protect* 80, 1964-1972, doi:10.4315/0362-028x.jfp-17-157 (2017).

- 8 Thung, T. Y. et al. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in microbiology* 8, 2697, doi:10.3389/fmicb.2017.02697 (2017).
- 9 Kovac, J. et al. Temporal Genomic Phylogeny Reconstruction Indicates a Geospatial Transmission Path of Salmonella Cerro in the United States and a Clade-Specific Loss of Hydrogen Sulfide Production. *Frontiers in microbiology* 8, 737, doi:10.3389/fmicb.2017.00737 (2017).
- 10 Haley, B. J. et al. Genomic and Evolutionary Analysis of Two Salmonella enterica Serovar Kentucky Sequence Types Isolated from Bovine and Poultry Sources in North America. *PloS one* 11, e0161225, doi:10.1371/journal.pone.0161225 (2016).
- 11 Sangal, V. et al. Evolution and population structure of Salmonella enterica serovar Newport. *J Bacteriol* 192, 6465-6476, doi:10.1128/JB.00969-10 (2010).
- 12 Zhang, S. et al. Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology* 53, 1685-1692, doi:10.1128/JCM.00323-15 (2015).
- 13 Bäumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 279-283 (1996).
- 14 Fang, F. C. et al. Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7502-7507 (1999).
- 15 Uzzau, S., Bossi, L. & Figueroa-Bossi, N. Differential accumulation of Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Molecular microbiology* 46, 147-156 (2002).
- 16 Yoon, S. H., Park, Y. K. & Kim, J. F. PAIDB v2.0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Res* 43, D624-630, doi:10.1093/nar/gku985 (2015).
- 17 Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* 8, 36-45, doi:10.1038/nchembio.741 (2011).
- 18 Marchler-Bauer, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 45, D200-D203, doi:10.1093/nar/gkw1129 (2017).
- 19 Spano, S., Ugalde, J. E. & Galan, J. E. Delivery of a Salmonella Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3, 30-38, doi:10.1016/j.chom.2007.11.001 (2008).
- 20 Faucher, S. P., Forest, C., Beland, M. & Daigle, F. A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of Salmonella enterica serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* 155, 477-488, doi:10.1099/mic.0.022988-0 (2009).

- 21 den Bakker, H. C. et al. Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC Genomics* 12, 425, doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-425> (2011).
- 22 Mezal, E. H., Bae, D. & Khan, A. A. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathog Dis* 72, 95-103, doi:10.1111/2049-632X.12191 (2014).
- 23 Voth, D. E., Broederdorf, L. J. & Graham, J. G. Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol* 7, 241-257, doi:10.2217/fmb.11.150 (2012).
- 24 EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 14, doi:10.2903/j.efsa.2016.4634 (2016).
- 25 Zaidi, M. B. et al. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis* 14, 429-435 (2008).
- 26 Narvaez-Bravo, C. et al. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot and Harvest Plant in Mexico. *J Food Prot* 76, 786-795 (2013).
- 27 Gragg, S. E. et al. Substantial within-animal diversity of *Salmonella* isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 79, 4744-4750, doi:10.1128/AEM.01020-13 (2013).
- 28 Habing, G. G. et al. Within-Farm Changes in Dairy Farm-Associated *Salmonella* Subtypes and Comparison to Human Clinical Isolates in Michigan, 2000-2001 and 2009. *Appl Environ Microbiol* 81, 5724-5735, doi:10.1128/AEM.00899-15 (2015).
- 29 Webb, H. E. et al. *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. *Frontiers in microbiology* 8, 2214, doi:10.3389/fmicb.2017.02214 (2017).
- 30 Gutiérrez-Cogco, L., Montiel-Vázquez, E., Aguilera-Pérez, P. & González-Andrade, M. C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica Mex* 42, 490-495 (2000).
- 31 Berriman, A. D., Clancy, D., Clough, H. E., Armstrong, D. & Christley, R. M. Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *Salmonella* in UK pig herds. *PloS one* 8, e66054, doi:10.1371/journal.pone.0066054 (2013).
- 32 Verbrugghe, E. et al. Host Stress Drives *Salmonella* Recrudescence. *Sci Rep* 6, 20849, doi:10.1038/srep20849 (2016).
- 33 Ginocchio, C. C., Rahn, K., Clarke, R. C. & Galán, J. E. Naturally Occurring Deletions in the Centisome 63 Pathogenicity Island of Environmental Isolates of *Salmonella* spp. *Infection and immunity* 65, 1267-1272 (1997).
- 34 Barat, S., Steeb, B., Mazé, A. & Bumann, D. Extensive In Vivo Resilience of Persistent *Salmonella*. *PloS one* 7, e42007, doi:10.1371/journal.pone.0042007 (2012).

- 35 McWhorter, A. R. & Chousalkar, K. K. Comparative phenotypic and genotypic virulence of Salmonella strains isolated from Australian layer farms. *Frontiers in microbiology* 6, 12, doi:10.3389/fmicb.2015.00012 (2015).
- 36 Rodriguez-Rivera, L. et al. Genomic characterization of Salmonella Cerro ST367, an emerging Salmonella subtype in cattle in the United States. *BMC Genomics* 15, 427, doi:https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-427 (2014).
- 37 Hensel, M. Evolution of pathogenicity islands of Salmonella enterica. *Int J Med Microbiol* 294, 95-102, doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.025 (2004).
- 38 Duffy, L. L., Dykes, G. A. & Fegan, N. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of Salmonella enterica serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia. *Food Research International* 45, 770-779, doi:10.1016/j.foodres.2011.04.024 (2012).
- 39 Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J. & Groisman, E. A. The SPI-3 Pathogenicity Island of Salmonella enterica. *Journal of Bacteriology* 181, 998-1004 (1999).
- 40 Morgan, E. et al. Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 54, 994-1010, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04323.x (2004).
- 41 Figueiredo, R. et al. Virulence Characterization of Salmonella enterica by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host S. Typhimurium. *PloS one* 10, e0135010, doi:10.1371/journal.pone.0135010 (2015).
- 42 Fowler, C. C. et al. Emerging insights into the biology of typhoid toxin. *Current opinion in microbiology* 35, 70-77, doi:10.1016/j.mib.2017.01.012 (2017).
- 43 Miller, R. A. & Wiedmann, M. The Cytolethal Distending Toxin Produced by Nontyphoidal Salmonella Serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi Induces DNA Damage in a Manner Similar to That of Serotype Typhi. *MBio* 7, doi:10.1128/mBio.02109-16 (2016).
- 44 Rodriguez-Rivera, L. D., Bowen, B. M., den Bakker, H. C., Duhamel, G. E. & Wiedmann, M. Characterization of the cytolethal distending toxin (typhoid toxin) in non-typhoidal Salmonella serovars. *Gut pathogens* 7, 19, doi:10.1186/s13099-015-0065-1 (2015).
- 45 Del Bel Belluz, L. et al. The Typhoid Toxin Promotes Host Survival and the Establishment of a Persistent Asymptomatic Infection. *PLoS pathogens* 12, e1005528, doi:10.1371/journal.ppat.1005528 (2016).
- 46 Suez, J. et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal Salmonella accounted for invasive disease in humans. *PloS one* 8, e58449, doi:10.1371/journal.pone.0058449 (2013).

- 47 Shintani, M., Sanchez, Z. K. & Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology* 6, 242, doi:10.3389/fmicb.2015.00242 (2015).
- 48 Lopez-Alonso, M. Trace minerals and livestock: not too much not too little. *ISRN Vet Sci* 2012, 704825, doi:10.5402/2012/704825 (2012).
- 49 Amachawadi, R. G. et al. Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol* 79, 4369-4375, doi:10.1128/AEM.00503-13 (2013).
- 50 Zhou, B. et al. Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms. *Journal of hazardous materials* 320, 10-17, doi:10.1016/j.jhazmat.2016.08.007 (2016).
- 51 Gokulan, K. et al. Impact of Plasmids, Including Those Encoding VirB4/D4 Type IV Secretion Systems, on *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Virulence in Macrophages and Epithelial Cells. *PLoS one* 8, e77866, doi:10.1371/journal.pone.0077866 (2013).
- 52 Hoffmann, M. et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *salmonella enterica* serotype heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 6, 1046-1068, doi:10.1093/gbe/evu079 (2014).
- 53 De la Garza, J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en tres etapas de la cadena productiva de carne de bovino Master in Science thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, (2015).
- 54 Ballesteros-Nova, N. et al. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Publica México* 58, 1-7 (2016).
- 55 Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., Curtiss, R. & Gyles, C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes* 6, 271-279 (1992).
- 56 Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data, <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>> (2010).
- 57 Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* btu170 (2014).
- 58 Wattam, A. R. et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research* 42, D581-D591 (2014).
- 59 Bankevich, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455-477, doi:10.1089/cmb.2012.0021 (2012).
- 60 Aziz, R. K. et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9, 75, doi:10.1186/1471-2164-9-75 (2008).
- 61 Overbeek, R. et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 42, D206-D214 (2014).

- 62 Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M. & Lund, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PloS one* 9, e104984, doi:10.1371/journal.pone.0104984 (2014).
- 63 Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol* 57, 758-771, doi:10.1080/10635150802429642 (2008).
- 64 Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8. (2010).
- 65 Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J. & Jin, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic Acids Res* 44, D694-697, doi:10.1093/nar/gkv1239 (2016).
- 66 Altschul, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402 (1997).
- 67 Carver, T. J. et al. ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics* 21, 3422-3423 (2005).
- 68 Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L. & Beatson, S. A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12, 402, doi:10.1186/1471-2164-12-402 (2011).
- 69 Petkau, A., Stuart-Edwards, M., Stothard, P. & Van Domselaar, G. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics* 26, 3125-3126, doi:10.1093/bioinformatics/btq588 (2010).
- 70 Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221-224, doi:10.1093/molbev/msp259 (2010).
- 71 Sievers, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539, doi:10.1038/msb.2011.75 (2011).
- 72 Castresana, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540-552 (2000).
- 73 Ronquist, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61, 539-542, doi:10.1093/sysbio/sys029 (2012).
- 74 Carattoli, A. et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 3895-3903 (2014).

Acknowledgments

This work was partially funded by the Mexican Association of Meat Science and Technology and The National Autonomous University of Mexico. WGS was funded by the US Food and Drug Administration (FDA) through the Genome Trakr Program.

We thank professionals from FDA's Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, Maryland, U.S.A., the Health Sciences Research and Development Center, Autonomous Nuevo León University, Monterrey, Mexico, and the Evolution of Metabolic Diversity Laboratory, Advanced Genomic Unit (Langebio), Cinvestav-IPN, Irapuato, Mexico for their technical assistance with experiments.

Author contributions

E.J.D.S conducted WGS, performed the bioinformatics analyses, and drafted the manuscript. N.S.M reviewed experiment design and assisted with bioinformatics. R.O.L, W.A.G, and M.S.R.L conceived the study, directed the research and supervised data acquisition and analysis. M.W.A helped with experiment design, supervised WGS of isolates, reviewed bioinformatic analyses, and supported in editing the manuscript to conform to correct scientific English. F.B.G critically reviewed experiment design, assisted with bioinformatics, supervised data analysis, and directed the revisions of the manuscript. All authors critically reviewed and approved the final manuscript.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28169-4>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Open Access. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third-party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. © The Author(s) 2018.

ARTÍCULO 2

PUBLICADO EN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

DOI: 10.1007/s12275-019-8421-3

Genomic surveillance links livestock production with the emergence and spread of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico

Enrique Jesús Delgado-Suárez^{1*}, Rocío Ortiz-López², Wondwossen A. Gebreyes³, Marc W. Allard⁴, Francisco Barona-Gómez⁵, and María Salud Rubio-Lozano¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

²Tecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences, Monterrey, Mexico

³College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, Columbus, Ohio, United States of America

⁴Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, U. S. Food and Drug Administration, College Park, Maryland, United States of America

⁵Evolution of Metabolic Diversity Laboratory, Unidad de Genómica Avanzada (Langebio), Cinvestav-IPN, Irapuato, Guanajuato, Mexico

Running title: Genomic surveillance of antimicrobial resistance in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*

Abstract

Multi-drug resistant (MDR) non-typhoidal *Salmonella* (NTS) is increasingly common worldwide. While food animals are thought to contribute to the growing antimicrobial resistance (AMR) problem, limited data is documenting this relationship, especially in low and middle-income countries (LMIC). Herein, we aimed to assess the role of non-clinical NTS of bovine origin as reservoirs of AMR genes of human clinical significance. We evaluated the phenotypic and genotypic AMR profiles in a set of 44 bovine-associated NTS. For comparative purposes, we also included genotypic AMR data of additional isolates from Mexico (n=1,067) that are publicly available. The most frequent AMR phenotypes in our isolates involved tetracycline (40/44), trimethoprim-sulfamethoxazole

*For correspondence. E-mail: enriquedelgado.suarez@gmail.com; Tel.: +52-55-56225858; Fax: +52-55-56225930

(26/44), chloramphenicol (19/44), ampicillin (18/44), streptomycin (16/44), and carbenicillin (13/44), while nearly 70% of the strains were MDR. These phenotypes were correlated with a widespread distribution of AMR genes (i. e. *tetA*, *aadA*, *dfrA12*, *dfrA17*, *sul1*, *sul2*, *bla*-TEM-1, *bla*CARB-2) against multiple antibiotic classes, with some of them contributed by plasmids and/or class-1 integrons. We observed different AMR genotypes for betalactams and tetracycline resistance, providing evidence of convergent evolution and adaptive AMR. The probability of MDR genotype occurrence was higher in meat-associated isolates than in those from other sources (odds ratio 11.2, 95% confidence interval 4.5-27.9, $P < 0.0001$). The study shows that beef cattle are a significant source of MDR NTS in Mexico, highlighting the role of animal production on the emergence and spread of MDR *Salmonella* in LMIC.

Introduction

Nontyphoidal *Salmonella* are among the leading causes of foodborne diseases worldwide ⁽¹⁾. In the last decade, the emergence of MDR NTS has led to increasing public health concerns at a global scale. Since MDR infections are difficult to treat and are more expensive, they may boost the already high disease burden in humans ⁽¹⁰⁾. Intense research in this field has improved our understanding of the basis of MDR. It is well established that acquired AMR in bacteria is favored by the use of antibiotics in animals and humans ⁽²⁰⁷⁾. Moreover, antibiotic use may lead to bacterial chromosomal mutations conferring resistance to certain antibiotics (i. e. quinolones resistance in enterobacteria) ⁽²⁰⁸⁾, which is then transmitted vertically onto the progeny. However, the horizontal acquisition of foreign mobile DNA is the most relevant factor for the acquisition and dissemination of bacterial AMR. Particularly, plasmids are known to confer resistance to multiple antibiotics and they also can be transmitted by conjugation between distant bacterial species ⁽²⁰⁹⁾. Hence, AMR surveillance is vital to contain the proliferation of MDR pathogens and their impact on public health.

Food animals, including beef cattle, are recognized as a possible source of MDR *Salmonella* ^(130,131). This has led to controversial discussions on whether the increasing AMR problem is associated or not with the use of antibiotics on farms. For instance, it has been demonstrated that livestock environments have a strong influence on the emergence and dissemination of specific MDR phenotypes among NTS isolated in the United States of America ⁽²¹⁰⁾. However, most of these isolates are of clinical origin. Although numerous studies have reported phenotypic and genotypic profiles of *Salmonella* AMR ^(11,171,211,212), comprehensive studies combining phenotypic

data with genome-wide searches for AMR determinants are still limited, especially in low and middle-income countries. This approach could help identifying novel resistance mechanisms, as well as the factors involved in AMR dissemination. Consequently, increased surveillance may facilitate depicting potential mitigation strategies to combat AMR.

Recent studies conducted by our research group showed bovine-associated NTS of different serovars are genotypically close to their counterparts from vegetables, produce, and the environment ⁽²¹³⁾. Hence, the current research presents a thorough characterization of the AMR phenotypes and genotypes of a subset of 44 non-clinical NTS isolates from Delgado-Suarez et al. (2018). Moreover, we compared the AMR genotypes of these isolates with those isolated from multiple sources within Mexico (n=1,067). The study reveals the proportion of MDR isolates in the studied sample is very high ($\approx 70\%$), in contrast with that observed in isolates from other sources ($< 20\%$). We also observed evidence of convergent evolution of isolates towards AMR to tetracycline and betalactams, suggesting heavy use of these antibiotics on farms. This highlights the role of livestock production in the emergence and spread of MDR *Salmonella* in Mexico. Although these are not disease-causing strains, the fact that they carry multiple AMR genes against several antibiotics included in the World Health Organization (WHO) list of critically and highly important antimicrobials raises concerns. Indeed, as we confirmed plasmids and class-1 integrons are significant contributors of acquired AMR genes among *Salmonella* populations, the risk of AMR dissemination among NTS and other species is a possibility. Finally, we observed AMR could also be associated with the presence of multidrug efflux pumps and/or triggered by stress response mechanisms, an area that requires further research.

Materials and methods

Bacterial strains

We used a subset of 44 NTS isolates from a previous study ⁽²¹³⁾, for which antibiotic susceptibility data were available. The strain panel was composed of seven different serovars, collected along the beef production continuum and from distant geographical locations within Mexico, providing the basis for a thorough characterization of the resistome of bovine-associated NTS from non-clinical sources (Figure 1). Every isolate was obtained from a different fecal, carcass, cut, or ground beef sample and some of them on different dates. Refer to supplementary Table S1 for strains accession numbers and metadata.

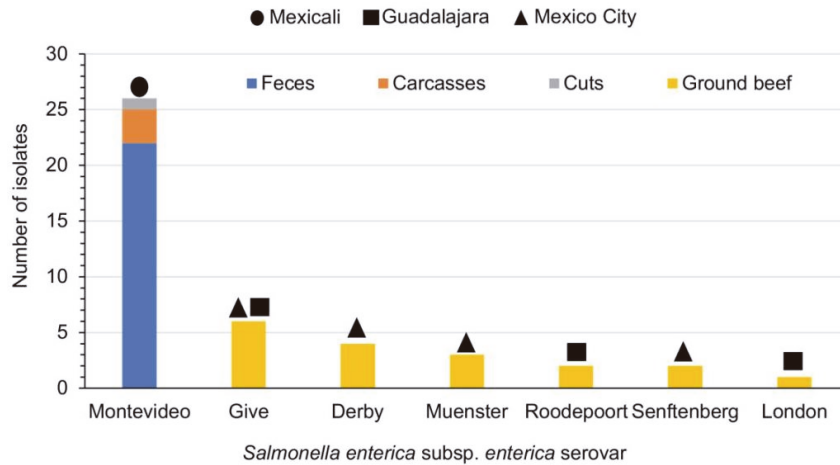


Figure 1. *Salmonella* isolates included in the study. Isolation source is color-coded, and geographical location is mapped onto the graph with black circles, squares or triangles. For *Salmonella* GIVE, n=4 in Mexico City, and n=2 in Guadalajara. Serovars were predicted with SeqSero software⁽¹⁷⁵⁾.

For the purpose of comparative analysis, we used additional NTS isolates from Mexico that are publicly available at NCBI and have AMR genotypic data. This comprised a subset of 65 isolates from the same serovars represented in our panel of strains, as well as the whole set of *Salmonella* isolates from Mexico in the database (n=1,067) as of July 24, 2018. Supplementary Table S2 contains the accessions and metadata of the additional isolates used in the study.

Antibiotic susceptibility testing

Antibiotic susceptibility testing (AST) was carried out with a panel of 17 antimicrobials included in the WHO list of critically important and highly important antimicrobials⁽¹²⁸⁾. We used the Kirby-Bauer disk diffusion method,⁽²¹⁴⁾ with the following BIO-RAD antimicrobial susceptibility test disks and the respective concentrations: ampicillin (Amp, 10 μ g), amoxicillin (Amx, 10 μ g), amoxicillin-clavulanic acid (Amc, 30 μ g), carbeniciline (Car, 100 μ g), ceftriaxone (Cro, 30 μ g), cephalothin (Cef, 30 μ g), cephotaxime (Ctx, 30 μ g), ciprofloxacin (Cip, 10 μ g), pefloxacin (Pef, 5 μ g), amikacin (Amk, 30 μ g), kanamycin (Kan, 30 μ g), gentamicin (Gen, 10 μ g), streptomycin (Str 10 μ g), netilmicine (Net, 30 μ g), trimethoprim-sulfamethoxazole (Stx, 250 μ g), chloramphenicol (Chl, 30 μ g), and

tetracycline (Tet, 30 μ g). Results were interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines ⁽²¹⁵⁾, using *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 as quality control organisms. Isolates showing resistance to ≥ 2 classes of antimicrobials were classified as MDR. Odds ratio calculations were used to test if AMR phenotypes were associated with serovar, isolation source and/or geographical location. Moreover, we estimated the association of resistance to different antibiotic classes by calculating Pearson correlation coefficients.

Whole genome sequencing, genome assembly and annotation

Genome sequencing, assembly, and annotation were performed as previously described ⁽²¹³⁾. Raw sequences are deposited at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) website. The SRA accessions are listed in supplementary Table S1, while assembly and annotation statistics are provided in supplementary Table S3.

Identification and comparative genomics of AMR genes

The genotypic AMR profile of our isolates was constructed based on the antibiotic resistance genes identified through genome annotation using the Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) as a reference ⁽¹⁶⁶⁾. We also screened the genomes for chromosomal point mutations conferring resistance to quinolones, colistin, and spectinomycin. For that purpose, we used ResFinder version 3 ^(148,172). Odds ratio was used to assess if the presence of AMR genes against a particular antibiotic class was associated with the presence of resistance genes against other antibiotic classes.

Since polymyxins resistance genes were detected in 100% of the isolates, we used the concatenated amino acid sequences of *arnC* and *arnT* genes for phylogenetic reconstruction. Both genes are part of the lipid A modification operon, which is one of the main mechanisms leading to polymyxin resistance. These sets of sequences were aligned in Seaview ⁽²⁰⁴⁾ through ClustalO ⁽²⁰⁵⁾ and curated with Gblocks ⁽²⁰⁶⁾. The resulting Nexus file was used to construct a phylogenetic tree using MrBayes 3.2.6 ⁽¹⁸³⁾ with the following

parameters: aamodelpr=mixed, samplefreq=100, burninfrac=0.25 in four chains and for 1 million generations. The analysis included sequences from *Salmonella bongori* (accession CP006608.1) as an outgroup.

Several multidrug efflux pump families were also present in 100% of the studied isolates. To assess their degree of conservation, we conducted a BLAST analysis using as reference the amino acid sequences of genes from the *Salmonella* Typhimurium LT2 genome (accession NC_003197.2): 1) *ydhE*, Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE family), 2) STM0382, Major Facilitator Superfamily (MFS), 3) *yadG*, ATP Binding Cassette (ABC superfamily), 4) *acrA*, Resistance, Nodulation, Division (RND family), and 5) *mdtC*, *mdtABCD* multi-drug resistance cluster.

Finally, we compared the AMR genotypes of our isolates with a subset (n=65) of additional *Salmonella* isolates from Mexico that are publicly available at NCBI (see supplementary Table S2). These included 18 isolates associated with livestock (bovine and porcine), as well as 47 isolates from fresh produce, vegetables, seafood, cheese, herbal tea, water, and sediment. The criteria of inclusion were: 1) isolates of the same serovars represented in our panel of strains, and 2) isolates with AMR data. In this way, we managed to get the genotypic AMR profile of additional isolates of all serovars but Roodepoort. We also analyzed the complete set of *Salmonella* isolates from Mexico that were available at NCBI (n=1,067, as of July 24th 2018, see supplementary Table S2), to assess the overall diversity of AMR genes and the rate of strains with MDR genomic profiles across different sources and/or hosts. AMR genotypes were collected from the NCBI's isolate browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens>), which are generated through the AMRFinder tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder>). Odds ratio and risk ratio calculations were performed to assess the influence of ecological niche and *Salmonella* serovar in the probability of isolates having MDR genotypes.

***In silico* plasmid profiling**

The presence of plasmids replicons was predicted with the aid of PlasmidFinder 1.3⁽¹⁵⁹⁾. The analysis was carried out with the raw reads at the Center for Genomic Epidemiology

web server using a threshold identity of 95%. If plasmid replicons were detected, we used the accession numbers of the prediction output to collect the plasmid's reference sequence from NCBI. The newly sequenced genomes were mapped against reference plasmids based on the identification of consecutive genes that were homologous between contigs and plasmids, as previously described ⁽⁸⁷⁾. If a majority of reference plasmid sequences (>70%) were represented in the corresponding isolate's contigs, these sets of contigs were proposed to be plasmids in the newly sequenced genomes.

Results

High frequency of MDR *Salmonella*

Salmonella isolates showed resistance to all the studied antibiotic classes except quinolones (Figure 2). The most common resistance phenotypes included tetracycline (40/44), trimethoprim-sulfamethoxazole (26/44), chloramphenicol (19/44), ampicillin (18/44), streptomycin (16/44), and carbenicillin (13/44). Conversely, resistance to third generation cephalosporins was infrequent. All isolates were susceptible to ceftaxime, while only one resisted ceftriaxone. Despite six isolates ($\approx 14\%$) that resisted cephalotine, there was no evidence of cross-resistance with any of the 3GC. Likewise, resistance to aminoglycosides other than streptomycin was rare, while all isolates were susceptible to amikacin. Interestingly, aminoglycoside resistance was observed more likely in isolates from Mexicali City as compared to those from Mexico City and Guadalajara (odds ratio, 4.2; 95% confidence interval (CI) 1.1-15.3).

Nearly 70% of the isolates were classified as MDR *Salmonella*, regardless of isolation source, serovar or geographical location. Strikingly, among these, 70% resisted ≥ 4 antibiotic classes. The tetra-resistance pattern Chl/Str/Sxt/Tet was the most prevalent ($n=15$) and was strongly associated with *Salmonella enterica* ser. Montevideo isolates from Mexicali City (odds ratio 27.2, 95% CI 3.1-237.3, $P=0.0001$). Overall, resistance to aminoglycosides had a strong positive correlation with resistance to chloramphenicol ($r=0.7286$, $P<0.0001$) and folate pathway inhibitors ($r=0.7025$, $P<0.0001$), whereas it was moderately correlated with resistance to tetracycline ($r=0.3022$, $P=0.0462$). Conversely,

none of the isolates from Mexicali City showed resistance to betalactams while 100% of those from Mexico City and Guadalajara resisted at least one of the tested drugs from this class. In line with these findings, resistance to betalactams was negatively correlated with resistance to aminoglycosides ($r=-0.3323$, $P=0.0275$).

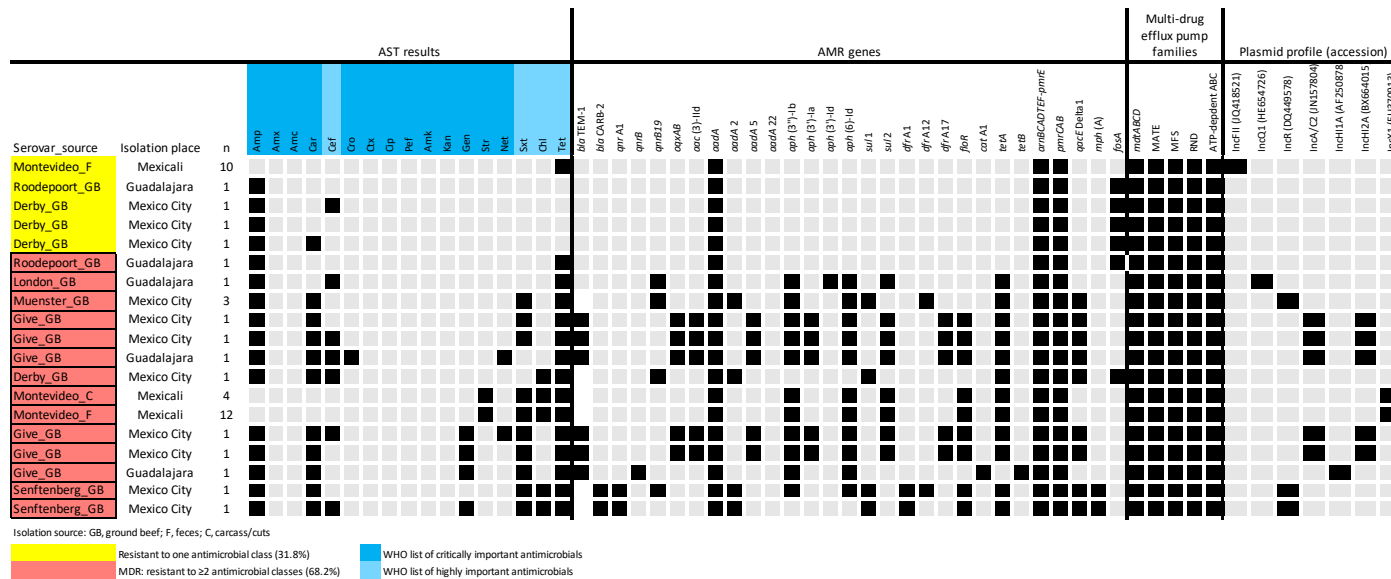


Figure 2. Antibiotic susceptibility testing (AST), antimicrobial resistance (AMR) genes, and plasmid profile results for *Salmonella* isolates of different serovars collected along the beef production chain in Mexico. Antimicrobials used for AST included ampicillin (Amp), amoxicillin (Amx), amoxicillin clavulanic acid (Amc), carbenicillin (Car), ceftriaxone (Cro), cephalotin (Cef), ceftotaxime (Ctx), ciprofloxacin (Cip), pefloxacin (Pef), amikacin (Amk), kanamycin (Kan), gentamicin (Gen), streptomycin (Str), netilmicin (Net), trimethoprim-sulfamethoxazole (Sxt), chloramphenicol (Chl), tetracycline (Tet). Results are color-coded as follows: grey cells = susceptible / AMR gene absent / plasmid replicon absent; black cells = resistant / AMR gene present / plasmid replicon present.

Genetic determinants of antimicrobial resistance

Genotypic AMR was broadly in agreement with AST results, with about 70% of the studied population carrying a wide repertoire of AMR genes against multiple antibiotic classes (Figure 2). However, nine isolates lacking obvious betalactamase genes still showed resistance to several of the tested betalactams. Likewise, another 11 isolates that resisted tetracycline do not carry any of the known tetracycline resistance genes. The opposite occurred with aminoglycosides, whereby 24 isolates carrying resistance genes against these drugs showed susceptible phenotypes. This is in line with the lack of point mutations related to aminoglycoside resistance in the genomes of the studied isolates. However, the most commonly found *aadA* gene was highly conserved across isolates, with an amino acid similarity above 99%, as shown by a BLAST analysis using the amino acid sequence of *Salmonella* Typhimurium LT2 (accession NP_460230.1) AadA protein as a reference.

Consistent with the observed susceptibility to quinolones, we did not detect any of the known point mutations associated with quinolone resistance. Interestingly, however, about one third of the isolates carried plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes, such as *qnrB*, *qnrB19*, and *oqxAB*. Moreover, genome annotation demonstrated the presence of resistance genes against other antimicrobials that were not included in the AST. Among these, the most relevant are the polymyxin resistance gene clusters (*pmr* and *arn* operons) which were present in the chromosome of 100% of the isolates. Although no point mutations were detected for these operons, phylogenetic analysis showed these lipopolysaccharide (LPS)-modifying genes are highly conserved across serovars, isolation sources, and geographical regions (Figure 3), suggesting that they are subjected to strong selective pressure. Moreover, it indicates fitness advantages associated with these genes exceed fitness cost.

Another important finding is the presence of genes conferring resistance to quaternary ammonium compounds (*qacEDelta1* gene) in ground beef isolates from distant geographical regions. Strikingly, the likelihood of isolates being MDR was greater when the *qacEDelta1* gene was present (odds ratio, 19.3; 95% CI 1.05-354.0, P=0.0464), suggesting possible co-selection of biocide and antibiotic resistance. Possibly related to this, genome annotations showed the entire set of isolates carry a vast repertoire of multi-

drug efflux pumps. This included the *mdtABCD* multi-drug resistance cluster, the *acrAB-toIC* efflux system, the ATP Binding Cassette (ABC) superfamily, the Major Facilitator Superfamily (MFS), the Resistance, Nodulation, Division (RND) family, and the Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) family. These genomic features were highly conserved across isolates with 99-100% amino acid similarity.

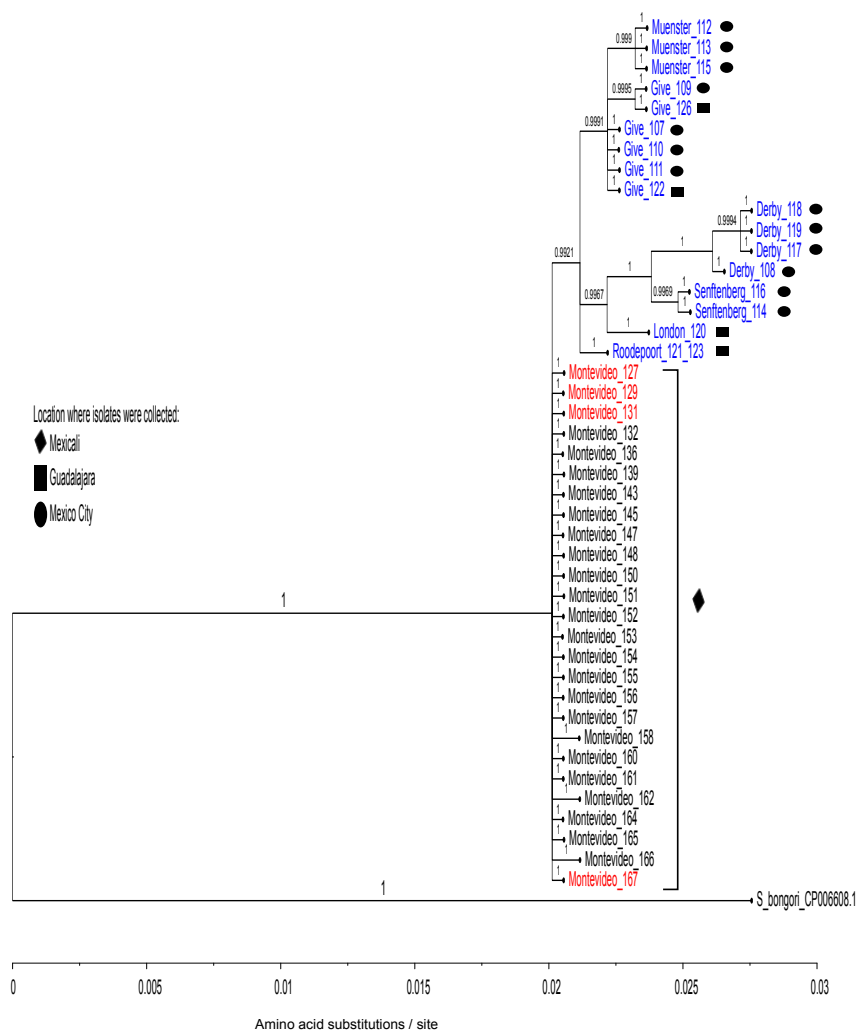


Figure 3. Concatenated phylogenetic analysis of polymyxin resistance ArnC and ArnT proteins from NTS strains of different serovars. Serovar and sample names are color-coded according to isolation source: blue, ground beef; red, carcasses/cuts; black, feces. The cities where isolates were collected are mapped onto the tree. Posterior probabilities are indicated close to each branch. Analysis conducted with MrBayes 3.2.6. For accession numbers of strains see supplementary Table S1.

Comparative analysis of AMR genotypes with other isolates from Mexico

We observed a higher abundance and diversity of AMR genes in isolates associated with meat production as compared to those from other sources in Mexico (Figure 4). Aminoglycoside resistance genes were by far the most commonly present, with over 97% of isolates from all sources and serovars carrying at least one of these genes. However, meat-associated isolates exhibited a higher AMR gene diversity. For instance, 63% of these isolates carry ≥ 3 different aminoglycoside resistance genes. Conversely, in those isolates from other sources only about 4% met this criterion.

The same trend was observed for AMR genes against different antibiotic classes. Nearly 73% of isolates from meat-related sources carry resistance genes against ≥ 2 antibiotic classes, while the same was true only for 19% of isolates from other sources. In fact, the probability of *Salmonella* having an MDR genotype was higher in isolates associated with meat production as compared to those from fresh produce, vegetables, seafood, cheese, and the environment (odds ratio 11.2, 95% CI 4.5-27.9, $P < 0.0001$).

We observed similar results when analyzing the whole dataset of isolates from Mexico at NCBI. Again, aminoglycoside resistance genes were the most commonly found in the genomes of NTS of all isolation sources and serovars (95.4%, $n=1,067$). Likewise, the risk of MDR-genotype occurrence was nearly 3 times higher in isolates linked to animal production ($P < 0.0001$) as compared to those from vegetables, produce, and the environment (Table 1). It should be noted that isolates of human origin were not included in the analysis because there were only 10 isolates from this ecological niche, with 50% of them having MDR genotypes. Regarding *Salmonella* serovars, the frequency of MDR genotypes was generally low, except for Derby, Agona, Montevideo, and Typhimurium, where the risk of finding MDR genotypes was significantly higher ($P < 0.0001$).

Source	Accession	AMR genes																						
		int1	int2	int3	int4	int5	int6	int7	int8	int9	int10	int11	int12	int13	int14	int15	int16	int17	int18	int19	int20	int21	int22	
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef carcass/cuts																							
Montevideo	Beef carcass/cuts																							
Montevideo	Beef carcass/cuts																							
Montevideo	Beef carcass/cuts																							
Derby	Ground beef																							
Derby	Ground beef																							
Derby	Ground beef																							
London	Ground beef																							
Muenster	Ground beef																							
Muenster	Ground beef																							
Muenster	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Senftenberg	Ground beef																							
Senftenberg	Ground beef																							
Rooibospoort	Ground beef																							
Rooibospoort	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Give	Ground beef																							
Muenster	Beef carcass/cuts																							
Muenster	Beef cattle feces																							
Muenster	Beef cattle feces																							
Newport	Beef cattle feces																							
Newport	Beef cattle feces																							
Newport	Beef cattle feces																							
Newport	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Montevideo	Beef cattle feces																							
Reading	Beef cattle feces																							
Reading	Beef cattle feces																							
Bergan	Beef cattle feces																							
Muenster	Pet treat - bovine origin																							
Muenster	Pet treat - bovine origin																							
London	Pet treat - porcine origin																							
Montevideo	Papaya																							
Montevideo	Papaya																							
Montevideo	Papaya																							
Montevideo	Papaya																							
Montevideo	Papaya																							
Montevideo	Cucumbers																							
Montevideo	Serrano peppers																							
Montevideo	Serrano peppers																							
Montevideo	Ancho peppers																							
Montevideo	Cuachalalate tea																							
Montevideo	Arnica flower tea																							
Montevideo	Dietary supplement																							
Montevideo	Organic tomatoes																							
Montevideo	Organic tomatoes																							
Montevideo	Parsley																							
Derby	Pet treat																							
Derby	Fresh cilantro																							
Derby	Papaya																							
Derby	Papaya																							
Derby	Crushed chilaca pepper																							
Derby	Jalapeno																							
Give	Sediment																							
Give	Water																							
Give	Oregano, dried																							
Give	Cucumbers																							
Give	Arnica flower tea																							
Give	Pasilla peppers																							
Give	Herbal tea																							
Give	Fresh basil																							
Give	Manzanilla																							
Give	Arnica flower tea																							
Give	Cheese, Mexican style																							
Give	Raw aquatic snails																							
Give	Natural sesame seed																							
Give	Cheese																							
Give	Papaya																							
Give	Chamomile powder																							
Muenster	Chamomile																							
Senftenberg	Papaya																							
Senftenberg	Papaya																							
Senftenberg	Snack dry charal (fish)																							
Senftenberg	Snails																							
Senftenberg	Animal feed																							
Senftenberg	Dried file fish																							
Senftenberg	Dried file fish																							

Figure 4. Comparison of AMR genotypes of *Salmonella* isolates associated with meat production (44 from this study and 18 additional Mexican isolates publicly available at NCBI, highlighted with bold letters); and those isolated from fresh produce, vegetables, seafood, cheese, herbal tea, water, and sediment in Mexico (n=47, publicly available at NCBI). Results are color-coded as follows: grey cells = AMR gene absent; black cells = AMR gene present.

Table 1. Evaluation of risk factors for the occurrence of MDR genotypes in *Salmonella* isolates from Mexico during the period 2013-2018 (n=1,067), based on ecological niche and serovar

Factor	n ¹	%MDR	Risk ratio	95% C. I. ²	P-value
Ecological niche					
Animal production	200	32.0	2.9	2.2-3.9	<0.0001
Vegetables & produce	652	11.2	0.5	0.4-0.7	<0.0001
Environment	167	9.6	0.6	0.4-1.0	0.0316
<i>Salmonella</i> serovar					
Montevideo	45	46.7	3.5	2.4-5.0	<0.0001
Agona	41	85.4	7.5	5.9-9.5	<0.0001
Typhimurium	19	31.6	2.1	1.1-4.2	<0.0001
Derby	10	90.0	6.3	4.8-8.2	<0.0001
Others*	645	7.1	0.7	0.5-1.1	0.1319

¹The sum by niche or serovar is <1,067 for there were isolates with no isolation source or serovar indicated. Moreover, niches or serovars with <10 isolates were excluded. Refer to supplementary Table S2 for accessions and metadata of additional isolates.

²95% confidence interval for the risk ratio.

*Group of isolates from multiple serovars with an MDR genotype frequency below 10%.

Plasmid profiling

We detected replicons from six different resistance plasmids in over 86% of isolates, except those of *S. enterica* ser. Derby and Roodepoort (Figure 2). Moreover, several *S. enterica* ser. Montevideo isolates (n=10) carry replicons of a virulence plasmid of the IncFII incompatibility group. Read mapping of reference plasmids against the newly sequenced genomes suggested these genetic elements are a significant mechanism of acquired AMR. For instance, the entire sequence of the IncQ1 plasmid, predicted in the *S. enterica* ser. London strain, was fully represented in this isolate's genome (see supplementary Figure S1). This plasmid carry aminoglycoside (*strB*, *aph(3'')-Ib*) and sulphonamide (*sul2*) resistance genes. Likewise, over 90% of the IncHI1A plasmid

sequence, which carries a tetracycline resistance gene cluster (*tetRACD*), was present in the genome of one *S. enterica* ser. Give strain (supplementary Figure S2). Moreover, most of IncHI2A plasmid sequence (73.6%) was represented in the genome of *S. enterica* ser. Give strains (supplementary Figure S3). This plasmid carries chloramphenicol (*cat*), tetracycline (*tetRAC*) and aminoglycoside (*aphA*) resistance genes. There was also a group of 16 isolates of *S. enterica* ser. Montevideo that showed 70% sequence identity to the IncX1 plasmid, which carries PMQR (*oqxAB*) and betalactamases (*blaTEM*) genes (supplementary Figure S4).

We observed a lower representation of plasmid IncA/C2 sequences in the genomes of *S. enterica* ser. Give isolates (55%), as well as of plasmid IncR sequences in the contigs of *S. enterica* ser. Muenster (58%) and Senftenberg (33.3-46.6%), respectively (supplementary Figures S5-S6). However, isolates carrying replicons of either plasmid encode class-1 integrons and multiple AMR genes in their chromosomes (Figure 2), which may have contributed to their MDR phenotypes. Nevertheless, most AMR genes in these isolates were outside the integron structure, which harbors only one or two resistance gene cassettes against aminoglycosides and/or sulphonamides (Figure 5).

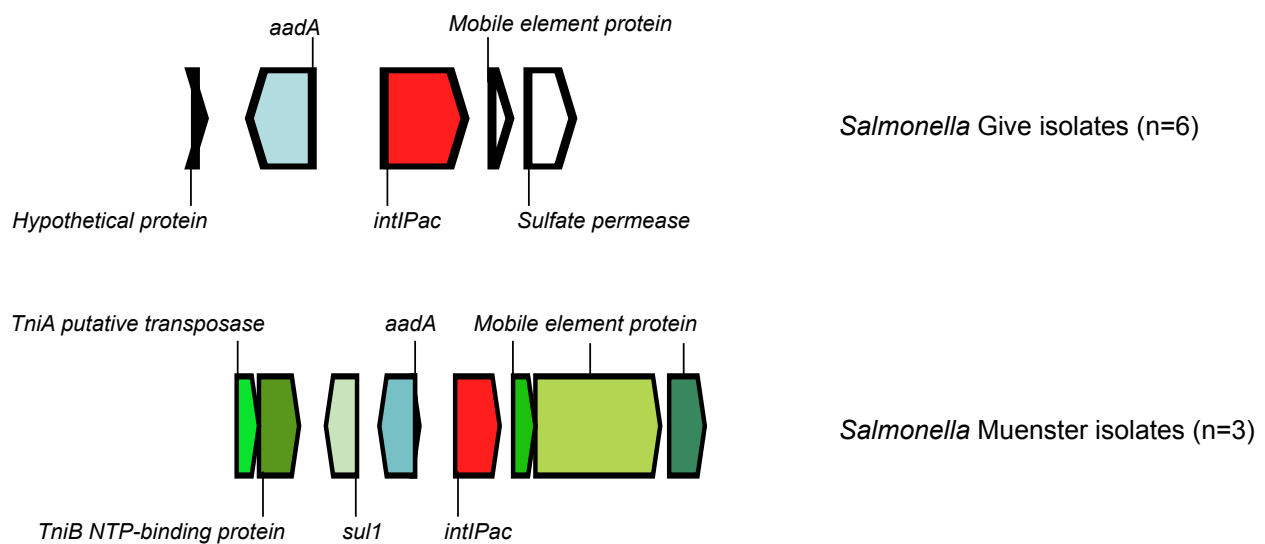


Figure 5. Schematic representation of the genomic context of class-1 integrons (*intIPac*) detected in *Salmonella* isolates of serovar Give and Muenster.

Discussion

Our results show that there is a high rate of MDR *Salmonella* among isolates collected from various non-clinical sources of bovine origin in Mexico. The MDR prevalence observed here is much higher than that reported 5-7 years ago in isolates from cattle and other food-producing animals in Africa ⁽²¹⁶⁾, Asia ⁽²¹⁷⁾, or Latin America ^(56,218). Although AMR of isolates usually vary across time and regions, these results show the emergence and spread of MDR pathogens is far from being controlled.

The most common resistance patterns (i. e. tetracycline, folate pathway inhibitors, amphenicols, betalactams, aminoglycosides) are similar to those reported previously in *Salmonella* isolated from beef sources ^(13,212,219). These findings are consistent with the current approval of these antibiotic classes for use in livestock in Mexico ⁽¹³⁴⁾. Conversely, we observed that resistance to third generation cephalosporins was low in isolates from the studied regions as compared to that observed in recent studies ^(13,212,220). Although these are not disease-causing strains, they carry multiple resistance determinants against several drugs of the WHO list of critically important and highly important antimicrobials ⁽¹²⁸⁾. Hence, they may act as reservoirs of AMR genes of human clinical significance, posing a serious public health risk. Moreover, the significant correlation of resistance to unrelated antibiotic classes led us to speculate a possible role of epistatic interactions leading to MDR phenotypes, an area that requires further research.

The extensive distribution of MDR isolates indicates animal production likely favors the emergence of MDR *Salmonella* genotypes in farm environments, mainly in the form of adaptive and acquired AMR. In that sense, our results showed the presence of different genetic determinants associated with the same resistance phenotype (i.e. tetracycline and betalactam resistance), which provides evidence of the convergent evolution of isolates as a result of environmental pressure. Overall, these findings implicate that several antibiotics are still heavily used in some livestock production settings in Mexico. Such practices put huge selective pressure on AMR genes. Consequently, optimizing the use of antimicrobials at the farm level is vital to reduce the risk of AMR gene dissemination, as well as human exposure to MDR *Salmonella*.

Comparative genomics showed there is a higher abundance and diversity of AMR genes in meat-associated and animal-associated isolates as compared to those collected from plant sources. While we did not find data on the consumption of antibiotics in either animal or plant production in Mexico, the use of antibiotics is known to be heavier in animals ⁽¹³²⁾. Hence, these results suggest there is a link between the more intensive use of antibiotics in livestock and a stronger AMR genotypic profile of *Salmonella* collected from animal sources. Although the number of isolates included in the analysis is large (n=1,067), we only included publicly available genomes. Therefore, it would be interesting to test whether this trend remains as more isolates from both sources are sequenced.

The fact that plasmids and class-1 integrons contributed resistance genes confirms they play a major role in the dissemination of acquired AMR. Class-1 integrons are frequently present in *Salmonella* isolates. This feature allows the pathogen to acquire resistance genes and disseminate them across its own and other bacterial species. In line with previous studies, we observed aminoglycoside and sulphonamide resistance genes are among the most common gene cassette arrays associated with class-1 integrons ^(217,221). Thus, the considerable proportion of resistant isolates to both antimicrobials in the studied samples is not surprising. This could also be one of the factors contributing to the widespread distribution of aminoglycoside resistance genes observed in the whole set of *Salmonella* isolates from food sources in Mexico that are publicly available at NCBI.

In this research, all strains carrying resistance plasmid replicons were MDR. This is further supported by the fact that all of these isolates carry toxin-antitoxin systems (i.e. *ccdAB*, *stbED*), which ensures that all of the progeny inherits the plasmid, stabilizing its fitness. Although the very nature of plasmids makes them attractive antimicrobial targets, it has been difficult to design feasible strategies to combat AMR through plasmid elimination. Interventions aimed at disrupting plasmid propagation, as well as toxin-antitoxin systems were deemed as promising strategies about a decade ago ^(155,156). However, the little progress that has been achieved in this area suggests that this is a strategic field of research that needs to be promoted.

The widespread distribution of highly-conserved multidrug efflux pumps among the studied isolates suggests they are strong contributors to the observed AMR phenotypes.

For instance, the *mdfA* gene, which belongs to the MFS efflux system, is known to confer resistance to a broad spectrum of drugs, including rifamycins and tetracycline ⁽²²²⁾. Likewise, upregulation of the *acrAB-toiC* efflux system by the *marRAB* operon confers resistance to ciprofloxacin, tetracycline and chloramphenicol ⁽²²³⁾. Given these facts, it is reasonable to consider multidrug efflux pump genes as potential targets for the development of novel antimicrobials.

Notably, our genotype data suggests that the pathogens may have an even stronger resistance phenotype than that suggested by AST. For instance, nearly one third of the isolates carry PMQR genes, which usually provide low-level quinolone resistance, below the CLSI breakpoint ⁽¹⁶⁹⁾. Hence, these isolates are usually susceptible to quinolones when subjected to AST. However, PMQR genes could lead to higher resistance phenotypes if the isolates are exposed to quinolones at therapeutic levels. Despite the lack of point mutations associated with quinolone resistance in the studied genomes, the presence of multiple PMQR genes (i.e. *oqxAB*, *qnrA*, *qnrB*) is worrisome since it has been linked to the emergence of ciprofloxacin resistant *Salmonella* ^(170,171). Furthermore, their presence in mobile genetic elements is an additional factor contributing to dissemination of fluoroquinolone resistance genes among bacterial pathogens of different species.

Along the same lines, considering the complex regulation of AMR responses in bacteria, isolates carrying aminoglycoside resistance genes that were susceptible in the AST may also show resistance in a human clinical setting. This is further supported by the BLAST analysis showing a high degree of conservation of the *aadA* gene, which was the most common aminoglycoside resistance gene among isolates. Similarly, the presence of macrolide, phosphomycin, and polymyxin resistance genes further implicates the significant source of therapeutic complications pose by these strains. Although the studied isolates did not carry mutations in these genes, it has been demonstrated that colistin resistance in *Salmonella* does not correlate with point mutations ⁽¹⁵⁰⁾. Fortunately, the risk of horizontal transfer of these particular AMR genes appears to be low, considering none of them seemed to be plasmid-borne. At least for polymyxins, there is an increasing prevalence of plasmid-carried resistance determinants (i. e. *mcr-1* gene) in Gram-negative bacteria across the globe, while reports in *Salmonella enterica* are still limited to some

European countries ⁽²²⁴⁾. Additional research involving gene expression under varied growing conditions may help complement our understanding of the actual risks associated with the AMR of environmental isolates.

Apart from antimicrobials, bacterial pathogens also deal with numerous stresses both inside the hosts and in the environment. These stresses can trigger various adaptive responses in the cell leading to changes in their antimicrobial susceptibility. For instance, resistance to betalactams and polymyxin B activates when the cell is exposed to cell wall-active agents ⁽¹⁵¹⁾. In this study, the likelihood of isolates being MDR was greater when the *qacEDelta1* gene was present. Probably, the membrane damage stress exerted by quaternary ammonium compounds promotes the recruitment of resistance determinants, leading to MDR phenotypes. Thus, further research on the influence of different stresses on the pathogen antimicrobial susceptibility, as well as the potential use of stress-response genes as therapeutic targets may lead to significant advances in AMR mitigation strategies.

In summary, this research showed that beef cattle represent an important reservoir of AMR genes of significant connotation for human health. It also provides comprehensive AMR data from a middle-income country, highlighting the role of animal production in these nations as a significant contributor to the emergence and spread of MDR *Salmonella*. Moreover, it emphasizes the need for continued AMR surveillance of *Salmonella* strains circulating in apparently healthy animals to improve public health protection. Of particular interest is the widespread distribution of highly conserved multidrug efflux systems in *Salmonella* populations, which likely contributes to MDR phenotypes. We believe this is a promising research topic that may help to fight bacterial resistance more efficiently. Our results also emphasize the relevance of class-1 integrons and plasmids in promoting acquired AMR. In that sense, it is important to develop feasible plasmid propagation control strategies to reduce the spread of AMR genes among bacterial populations. Finally, further research on stress-induced AMR may shed additional light on the dissemination of AMR in food-associated isolates.

Acknowledgments

This work was partially funded by the National Autonomous University of Mexico, grant number PAPIIT IN212817. Whole genome sequencing of isolates was funded by the US Food and Drug Administration (FDA) through the GenomeTrakr Program. The authors are grateful for the technical assistance with experiments provided by professionals from the Center for Food Safety and Applied Nutrition, College Park, Maryland, U.S.A., and from the Infectious Diseases Molecular Epidemiology Laboratory, College of Veterinary Medicine, Ohio State University.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

MSRL, ROL and WAG designed and directed the research. EJDS performed research and wrote the draft manuscript. MWA and FBG assisted with experiment design and data analysis. All authors critically reviewed and contributed to the final version of the paper.

References

- An, R., Alshalchi, S., Breimhurst, P., Munoz-Aguayo, J., Flores-Figueroa, C., and Vidovic, S. 2017. Strong influence of livestock environments on the emergence and dissemination of distinct multidrug-resistant phenotypes among the population of non-typhoidal *Salmonella*. *PloS one* 12, e0179005.
- Antunes, P., Machado, J., and Peixe, L. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 58, 297-304.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.M., and Olaitan, A.O. 2016. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* 48, 583-591.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45, 493-496.
- Brichta-Harhay, D.M., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., and Koohmaraie, M. 2011. Diversity of multidrug-resistant *salmonella enterica* strains associated with cattle at harvest in the United States. *Appl Environ Microbiol* 77, 1783-1796.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., and Hasman, H. 2014. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58, 3895-3903.

Castresana, J. 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17, 540-552.

Chang, H.H., Cohen, T., Grad, Y.H., Hanage, W.P., O'Brien, T.F., and Lipsitch, M. 2015. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 79, 101-116.

CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

Delgado-Suarez, E.J., Selem-Mojica, N., Ortiz-Lopez, R., Gebreyes, W.A., Allard, M.W., Barona-Gomez, F., and Rubio-Lozano, M.S. 2018. Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal Salmonella. *Sci Rep* 8, 9864.

Dhanani, A.S., Block, G., Dewar, K., Forgetta, V., Topp, E., Beiko, R.G., and Diarra, M.S. 2015. Genomic Comparison of Non-Typhoidal Salmonella enterica Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. *PloS one* 10, e0128773.

Edgar, R., and Bibi, E. 1997. MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol* 179, 2274-2280.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 27, 221-224.

Hoffmann, S., Batz, M.B., and Morris, J.G., Jr. 2012. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot* 75, 1292-1302.

Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S., Wright, G.D., and McArthur, A.G. 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45, D566-D573.

Junod, T., López-Martín, J., and Gädicke, P. 2013. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de Salmonella enterica en muestras de origen animal y alimentario. *Rev Med Chile* 141, 298-304.

Kalambhe, D.G., Zade, N.N., Chaudhari, S.P., Shinde, S.V., Khan, W., and Patil, A.R. 2016. Isolation, antibiogram and pathogenicity of Salmonella spp. recovered from slaughtered food animals in Nagpur region of Central India. *Vet World* 9, 176-181.

Karczmarczyk, M., Martins, M., McCusker, M., Mattar, S., Amaral, L., Leonard, N., Aarestrup, F.M., and Fanning, S. 2010. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS Microbiol Lett* 313, 10-19.

Lin, D., Chen, K., Wai-Chi Chan, E., and Chen, S. 2015. Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne Salmonella strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Sci Rep* 5, 14754.

Lujan, S.A., Guogas, L.M., Ragonese, H., Matson, S.W., and Redinbo, M.R. 2007. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12282-12287.

McEwen, S.A., and Fedorka-Cray, P.J. 2002. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 (Suppl 3), S93-S106.

Meng, H., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Li, L., Miyoshi, S., Yan, H., and Shi, L. 2011. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Salmonella* strains isolated from food products of animal origin. *Int J Food Microbiol* 149, 274-277.

Mir, R.A., Weppelmann, T.A., Johnson, J.A., Archer, D., Morris, J.G., Jr., and Jeong, K.C. 2016. Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle. *PloS one* 11, e0163279.

OECD. 2016. Antimicrobial resistance. Policy insights. Available online: <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Policy-Insights-November2016.pdf> (accessed on 5 October 2018).

Perez-Montaña, J.A., González-Aguilar, D., Barba, J., Pacheco-Gallardo, C., Campos-Bravo, C.A., García, S., Heredia, N.L., and Cabrera-Díaz, E. 2012. Frequency and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serotypes on Beef Carcasses at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* 75, 867-873.

Poole, K. 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67, 2069-2089.

Qiu, H., Gong, J., Butaye, P., Lu, G., Huang, K., Zhu, G., Zhang, J., Hathcock, T., Cheng, D., and Wang, C. 2018. CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between *gyrA* mutation and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 365.

Quesada, A., Porrero, M.C., Tellez, S., Palomo, G., Garcia, M., and Dominguez, L. 2015. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70, 71-74.

Quesada, A., Reginatto, G.A., Ruiz Español, A., Colantonio, L.D., and Burrone, M.S. 2016. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 33, 32.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., and Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61, 539-542.

SAGARPA. 2018. Productos químico-farmacéuticos vigentes 2017. Available online: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/regulacion-de-productos-veterinarios> (accessed on 5 October 2018).

Schmidt, J.W., Agga, G.E., Bosilevac, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Shackelford, S.D., Wang, R., Wheeler, T.L., and Arthur, T.M. 2015. Occurrence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* and

Salmonella enterica in the Beef Cattle Production and Processing Continuum. *Appl Environ Microbiol* 81, 713-725.

Sibhat, B., Molla Zewde, B., Zerihun, A., Muckle, A., Cole, L., Boerlin, P., Wilkie, E., Perets, A., Mistry, K., and Gebreyes, W.A. 2011. Salmonella serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in Ethiopia. *Zoonoses and public health* 58, 102-109.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., and Higgins, D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7, 539.

Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22, 664-689.

Swick, M.C., Morgan-Linnell, S.K., Carlson, K.M., and Zechiedrich, L. 2011. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 921-924.

Talbot, E.A., Gagnon, E.R., and Greenblatt, J. 2006. Common Ground for the Control of Multidrug-Resistant Salmonella in Ground Beef. *Clinical Infectious Disease* 42, 1455-1462.

Van, T.T., Nguyen, H.N., Smooker, P.M., and Coloe, P.J. 2012. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal Salmonella enterica isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int J Food Microbiol* 154, 98-106.

Varela-Guerrero, J.A., Talavera-Rojas, M., Gutierrez-Castillo Adel, C., Reyes-Rodriguez, N.E., and Vazquez-Guadarrama, J. 2013. Phenotypic-genotypic resistance in Salmonella spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod* 45, 995-1000.

WHO. 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Available online: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/ (accessed on 5 October 2018).

WHO. 2017. WHO list of critically important antimicrobials for human medicine 5th revision. Available online: <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/> (accessed on 5 October 2018).

Williams, J.J., and Hergenrother, P.J. 2008. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12, 389-399.

Zankari, E., Allesoe, R., Joensen, K.G., Cavaco, L.M., Lund, O., and Aarestrup, F.M. 2017. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 72, 2764-2768.

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., and Larsen, M.V. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67, 2640-2644.

Zhang, S., Yin, Y., Jones, M.B., Zhang, Z., Deatherage Kaiser, B.L., Dinsmore, B.A., Fitzgerald, C., Fields, P.I., and Deng, X. 2015. Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology* 53, 1685-1692.

Publicación sujeta a suscripción. Los derechos de autor corresponden a Springer Nature. La versión final del manuscrito estará disponible en el sitio web de la revista *Journal of Microbiology*, bajo el DOI: 10.1007/s12275-019-8421-3.

DISCUSIÓN

En este proyecto de investigación se secuenció el genoma completo y se realizaron análisis de genómica comparativa de cepas de *S. enterica* de diez serotipos, recolectadas en diferentes segmentos de la cadena productiva, en un período de nueve meses y en diferentes regiones de México. De esta forma, se garantizó que la muestra experimental fuera válida para analizar la diversidad genética en la población bajo estudio, así como para identificar características genómicas que pudieran asociarse con patogenicidad, RAM y persistencia en la especie bovina.

Las características genómicas generales de los aislamientos secuenciados (ej. tamaño del genoma, densidad genética, % de G+C) son similares a las reportadas para las cepas de referencia,^(225,226) algo esperado tomando en cuenta que *Salmonella* es un organismo que tiende a ser clonal.⁽⁵⁾

Los serotipos que se detectaron en este trabajo han sido reportados previamente en cepas no clínicas de origen bovino.^(36,43,56) Además, algunos de ellos (ej. serotipos Montevideo, Muenster, Give, Reading) han sido detectados en estudios recientes realizados en México.^(39,49) Asimismo, la sobrerrepresentación de *S. enterica* ser. Montevideo es consistente con el creciente predominio de esta serovariedad en ganado bovino portador asintomático en América del Norte.^(34,36,54)

La anotación de los genomas, que incluye la tipificación por multilocus basada en el esquema de Achtman, que compara siete genes esenciales,⁽²²⁷⁾ evidenció que la mayoría de los aislamientos pertenecen secuencias tipo (ST) que rara vez se asocian con infecciones humanas. Sólo las cepas de *S. enterica* ser. Newport son de ST frecuentemente implicados en casos clínicos.⁽¹⁷³⁾

A pesar de lo anterior, cabe indicar que los serotipos aquí identificados se han asociado previamente con casos clínicos en humanos, según lo documenta uno de los estudios epidemiológicos más abarcadores que se han realizado en México.⁽³⁷⁾ Por tanto, la relevancia de estos aislamientos como reservorios de infecciones transmitidas por alimentos no debe minimizarse.

Estos hallazgos confirman la relevancia de la especie bovina como reservorio de *Salmonella*, especialmente cuando el patógeno logra establecerse en animales portadores asintomáticos.^(43,105) Como el ganado infectado no muestra signos clínicos, es aprobado para la matanza, con el riesgo consecuente de diseminación que ello implica. Sobre todo, si se toma en cuenta que estos portadores asintomáticos suelen intensificar la excreción de *Salmonella* en heces producto del estrés asociado con el transporte y el manejo *ante mortem*.

El análisis de la diversidad genética basado en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), evidenció *Salmonella* es capaz de diseminarse hasta los puntos de venta, así como a lo largo de zonas geográficas separadas entre sí por más de 500 a 2,000 km. La inclusión de aislamientos mexicanos de otras fuentes, disponibles públicamente en NCBI, confirmó la pertinencia de estos hallazgos. Las cepas de este estudio mostraron clonalidad con las recolectadas de diversos vegetales y del ambiente a lo largo de varios años. Ello confirma la persistencia de aislamientos en diferentes nichos ecológicos, así como su eficiente diseminación en las cadenas productivas.

Algunos serotipos (Newport, Reading, London), resultaron muy cercanos genéticamente a cepas involucradas en infecciones humanas. Esto confirma que no se debe descartar el potencial de las cepas que circulan en animales aparentemente sanos para causar infecciones transmitidas por alimentos; algo que fue confirmado por los resultados del perfil genómico de virulencia.

Algunos factores de adhesión fimbrial (ej. genes *lpf*) y de supervivencia intracelular (ej. gen *sodCI*) sólo estuvieron presentes en las cepas más cercanas a *Salmonella* Typhimurium LT2 (ej. serotipos Newport, Reading, London, Senftenberg, Bergen). Sin embargo, estos genes no están uniformemente distribuidos en *S. enterica*,⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾ y tampoco han sido reportados como esenciales para la colonización intestinal en todas las especies animales.^(176,177)

En línea con lo anterior, es difícil vincular las variaciones observadas en las SPI con fenotipos menos virulentos. De hecho, las cepas de *S. enterica* ser. Reading, a pesar de que tenían una delección de varios loci en la SPI1, estaban presentes en las heces. Se ha

demostrado que la disrupción de varios genes de las SPI 1, 2 y 3 no afectan la colonización de pollos, cerdos ni bovinos.⁽⁴⁾ En la presente investigación, sin embargo, se observó que la SPI4, considerada como clave en la colonización de la especie bovina,⁽¹⁸⁵⁾ está 100% conservada en todos los aislamientos. Por tanto, considerando la redundancia metabólica de *Salmonella*, así como las limitadas variaciones observadas en los genes asociados con la patogénesis, existen muy pocos elementos que sustenten una virulencia disminuida en las cepas estudiadas.

Una característica genómica de las cepas estudiadas que quizá pudiera influir en la generación de portadores asintomáticos es la presencia de genes codificantes de toxinas que suelen ser típicos de cepas tifoideas. El 76% de los aislamientos estudiados portaba genes de la toxina tifoidea (*cdtB*, *pltA*, *pltB*), así como de la hemolisina E (*hlyE*) y de la invasina asociada a Typhi (*taiA*), factores previamente descritos en las SPI11⁽¹⁰⁸⁾ y 18⁽¹²³⁾ de *Salmonella* Typhi, respectivamente. Aunque este hallazgo se había reportado previamente en un limitado número de aislamientos,^(181,182,186) no se encontró en la literatura ningún estudio previo en el que se observara la presencia masiva de estos genes en cepas asociadas con una misma especie animal, de cuatro serotipos distintos y provenientes de zonas geográficas distantes.

Entre las toxinas identificadas, la toxina tifoidea es la que ha recibido mayor atención por la comunidad científica. Ello obedece a que esta juega un papel central en la patogénesis de la fiebre tifoidea, en la cual se supone es un factor clave para el éxito de *Salmonella* Typhi de generar portadores asintomáticos.⁽¹⁰⁷⁾ Por tanto, la comprensión de su funcionamiento en cepas no tifoideas podría contribuir a mejorar el conocimiento sobre la patogénesis de la fiebre entérica.

Aunque experimentos *in vitro* con cepas no tifoideas han demostrado el fenotipo citotóxico de la toxina tifoidea producida por estos aislamientos;^(115,116) ensayos *in vivo* con ratones han demostrado que prácticamente no provoca daños a nivel intestinal, a la vez que promueve la supervivencia del hospedero y las infecciones persistentes.^(117,118) Por tanto, es probable que estos genes pudieran contribuir a la persistencia de *S. enterica* no tifoidea y/o a la generación de portadores asintomáticos en diferentes especies animales. Sin embargo, se requieren de nuevos estudios para confirmar esta hipótesis.

El análisis filogenético realizado con los genes codificantes de estas toxinas, el cual involucró las 45 cepas de este estudio, así como otros 63 aislamientos de cinco continentes y múltiples fuentes, no mostró señal alguna de que la presencia de las toxinas estuviera asociada con alguna especie o nicho ecológico particular. Sin embargo, la presencia masiva de estos genes en la muestra estudiada no parece un evento aleatorio. Una posible explicación es que las cepas porten estos genes, pero no los expresen, pues se ha descrito la toxina tifoidea sólo se expresa cuando la bacteria se ha internalizado en las células del hospedero.⁽¹¹³⁾ Por tanto, es probable que las cepas adaptadas al nicho intestinal no requieran las toxinas para crecer y aumentar su potencial de diseminación. Sin embargo, estos genes mostraron un alto grado de conservación, lo que indica que las toxinas deben jugar un papel importante para la supervivencia del patógeno y/o para la interacción con las células del hospedero. De otra forma, estos genes, adquiridos por transferencia horizontal, se habrían degradado o eliminado del genoma. Es evidente que se requiere de más investigación para dilucidar si las toxinas tifoideas representan alguna ventaja adaptativa o contribuyen a generar portadores asintomáticos en cepas no tifoideas asociadas con animales.

Los plásmidos constituyen otro factor clave que contribuye a la evolución y a la adaptación en las poblaciones bacterianas.⁽¹⁸⁷⁾ Así lo confirman los resultados del presente trabajo, en el cual las cepas que tuvieron una distribución geográfica más amplia (ej. serotipos GIVE y Muenster), portaban plásmidos con genes de resistencia a múltiples clases de antimicrobianos, así como a metales pesados. Esto puede representar una ventaja adaptativa en el contexto de la producción intensiva de carne bovina, donde el empleo de suplementación mineral, así como el tratamiento con antibióticos, son prácticas frecuentes. En este sentido, investigaciones recientes demuestran que la suplementación mineral de las dietas influye significativamente en la frecuencia con que se presentan genes de resistencia a metales pesados en cepas asociadas con animales.^(189,190) También lo confirma el creciente predominio de cepas MDR en las poblaciones de *Salmonella* asociadas con la producción animal.^(13,130,210)

Los plásmidos también pueden aportar factores de virulencia,⁽²²⁸⁾ fenómeno que también se observó en el presente estudio. Sin embargo, resultó interesante que sólo las cepas

de *Salmonella* Montevideo, que fue el serotipo predominante entre los aislamientos recolectados del rastro (29/39), portaban plásmidos de conjugación del tipo VirB/D4. Estos plásmidos codifican un T4SS, el cual constituye un mecanismo alternativo de invasión al T3SS codificado en la SPI1⁽⁸³⁾ y se ha identificado también como un factor importante en las infecciones persistentes causadas por varios patógenos.⁽⁸²⁾

A pesar de que se realizó una amplia búsqueda de literatura, no se encontraron reportes previos que documenten una distribución generalizada de T4SS en cepas de *Samonella* Montevideo. Esto fue confirmado por el análisis BLAST con 86 cepas adicionales de este serotipo, provenientes de alimentos, casos clínicos y del ambiente en México, Canadá y Estados Unidos, donde sólo 2 de las 86 cepas portaban estos genes. Ello evidencia que no se trata de una característica uniformemente distribuida en el serotipo Montevideo y que, posiblemente, su predominancia en la población estudiada se asocie con la adaptación al nicho ecológico.

La hipótesis anterior es apoyada por evidencia experimental que documenta la modulación negativa de la respuesta inmune innata, así como una invasión más eficiente de células epiteliales y de macrófagos en comparación con el T3SS-SPI1, por cepas de *S. enterica* ser. Heidelberg portadoras de T4SS, cuyos genes eran sobreexpresados durante el proceso de invasión.⁽⁸³⁾ Adicionalmente, los plásmidos VirB/D4 identificados en este estudio portan clústers de genes toxina/antitoxina (ej. *ccdAB*, *stbED*). A estos sistemas se les considera como genes de estabilidad, pues tienen la función de asegurar que el plásmido sea heredado por toda la progenie. En caso contrario, las células descendientes que no lo porten son eliminadas por la toxina, un proceso conocido como muerte post-segregacional.⁽²²⁹⁾ De esta forma, los sistemas toxina/antitoxina contribuyen a estabilizar los genes codificantes del T4SS en el nicho bajo estudio. No obstante, se requiere de más investigación para determinar si el T4SS presente en las cepas de *Salmonella* Montevideo representa una ventaja para la colonización asintomática de los bovinos.

En materia de resistencia a antibióticos, el estudio demostró que la especie bovina constituye un importante reservorio de cepas MDR y que la emergencia y la diseminación de genes de RAM dista mucho de estar bajo control.

En línea con trabajos anteriores realizados en México y en otros países, los perfiles de resistencia más frecuentes involucraron a tetraciclinas, sulfonamidas, betalactámicos, aminoglucósidos y anfenicoles.^(12,13,212,219) Estos hallazgos son congruentes con la aprobación de estas clases de antibióticos para uso veterinario en México.⁽¹³⁴⁾

Aunque la frecuencia de fenotipos resistentes a 3GC fue baja, mientras que no se detectó resistencia a quinolonas, casi 70% de los aislamientos porta genes de resistencia a antibióticos considerados como de importancia crítica o muy importantes por la OMS.⁽¹²⁸⁾ Por tanto, este trabajo demuestra que las cepas de origen no clínico asociadas con ganado bovino de carne actúan como reservorios de genes de RAM de relevancia clínica en humanos, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública.

La amplia distribución de cepas MDR en la muestra estudiada sugiere que la producción animal podría favorecer la emergencia y el predominio de ciertos genotipos MDR. Esto se confirmó con el análisis del perfil genómico de resistencia, que evidenció la presencia de diferentes genes de resistencia asociados con el mismo fenotipo, particularmente en tetraciclinas y betalactámicos. Lo anterior es prueba de convergencia evolutiva condicionada por la presión selectiva del nicho ecológico. Además, sugiere el uso intenso de algunos antibióticos en producción animal en México, lo que representa una presión selectiva considerable sobre los genes de RAM. Por tanto, la disminución del riesgo de diseminación de genes de RAM, así como de la exposición humana a *Salmonella* MDR, requiere que se optimice la aplicación de antibióticos en las granjas.

En línea con la alta frecuencia de fenotipos MDR que se observó, cerca del 70% de las cepas bajo estudio portaban una gran variedad de genes de RAM contra varias clases de antibióticos. La mayor parte de estos genes estaban codificados en integrones de clase 1 y en plásmidos, lo que confirma el relevante papel de estos elementos móviles en la diseminación de genes de RAM.⁽¹⁵⁴⁾

A semejanza de estudios previos con *S. enterica*, los integrones identificados en nuestros aislamientos contienen genes de resistencia contra aminoglucósidos y sulfonamidas.^(217,221) Ello podría estar relacionado con la alta frecuencia de cepas resistentes a ambas clases de antibióticos que aquí se observó, así como con la amplia

distribución de genes de resistencia a aminoglucósidos en cepas de *Salmonella* de origen mexicano, sin importar la fuente de aislamiento.

En el presente estudio, el 100% de las cepas que portaban replicones de plásmidos de resistencia mostraron un fenotipo MDR. La reconocida relevancia de los plásmidos en la diseminación de genes de RAM ha hecho que se investigue la posibilidad de interrumpir la propagación de los mismos.^(155,156) Sin embargo, hasta la fecha no se han obtenido resultados satisfactorios, por lo que se requiere continuar la investigación en esta área, la cual podría generar una estrategia efectiva para contener la diseminación de genes de RAM.

Otro determinante genético que pudo contribuir al perfil MDR de la mayor parte de las cepas es la presencia generalizada de genes codificantes para bombas de eflujo activo. Estudios genómicos previos han documentado que el gen *mdfA*, perteneciente a la familia MFS de bombas de eflujo, confiere resistencia a tetraciclinas y rifamicinas.⁽²²²⁾ También se ha demostrado que la activación de bombas de eflujo de la familia RND resulta en un perfil de multirresistencia a quinolonas, tetraciclinas y cloramfenicol.⁽²²³⁾ Considerando el alto grado de conservación de los genes codificantes para bombas de eflujo en las cepas estudiadas, resulta interesante explorar la posibilidad de utilizarlos como dianas para el desarrollo de nuevos antimicrobianos.

Aunque no se detectaron mutaciones asociadas con resistencia a quinolonas, aminoglucósidos o polimixinas, las cepas portaban genes que confieren resistencia a todas estas clases. En el caso particular de las quinolonas, destaca la presencia de genes codificados en plásmidos, los denominados PMQR, los cuales confieren un nivel bajo de resistencia, que normalmente no se detecta en las pruebas de susceptibilidad.⁽¹⁶⁹⁾ No obstante, las cepas portadoras de genes PMQR resultan preocupantes, pues se ha demostrado que estos genes han sido fuente de complicaciones terapéuticas, al asociarse con resistencia a ciprofloxacino, una de las últimas líneas de defensa contra la salmonelosis invasiva.⁽¹⁷⁰⁾ Otro riesgo importante es el asociado con los genes *oqxAB*, los cuales activan las bombas de flujo de la familia RND,⁽¹⁶⁷⁾ que son de amplio espectro, lo que puede resultar en un fenotipo MDR. Finalmente, el hecho de ser genes portados

en plásmidos implica un riesgo adicional, por el potencial de diseminación asociado con los mismos.

En el caso de las polimixinas, considerados antibióticos de importancia crítica y máxima prioridad para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas MDR, se tiene la ventaja relativa de que los genes de resistencia que se detectaron son de origen cromosomal. Por tanto, su potencial de diseminación es menor comparado con los genes codificados en plásmidos e integrones. Aunque ya se han reportado genes de origen plasmídico que confieren resistencia polimixinas (*mcr-1*), su presencia en *S. enterica* es aún limitada, reportándose hasta el momento en algunas cepas aisladas en países europeos.⁽²²⁴⁾

El hallazgo de genes que confieren resistencia a fosfomicina y macrólidos, antibióticos que no fueron incluidos en las pruebas de susceptibilidad, resalta la importancia que pueden tener las cepas asociadas con alimentos en la diseminación de genes de RAM de relevancia clínica en humanos. En este sentido, los análisis de genómica comparativa de cepas mexicanas (n=1,067) aquí realizados, confirmaron que existe una relación aparente entre los perfiles genotípicos de resistencia más fuertes de cepas asociadas con la ganadería y el uso más intenso de antibióticos en el sector pecuario.

Aunque no se encontraron datos sobre el consumo de antibióticos para fines veterinarios o agrícolas en México, en general se conoce que se utilizan más en producción animal.⁽¹³²⁾ Aunque el número de aislamientos que se incluyó en el análisis es considerable, se debe tomar en cuenta que se trabajó únicamente con las cepas disponibles en NCBI. Por tanto, sería interesante evaluar si esta tendencia, hacia una mayor abundancia y diversidad de genes de RAM, en cepas asociadas con alimentos de origen animal, se mantiene a medida que aumenta el número de genomas de ambas fuentes secuenciados en la base de datos.

Además de los antibióticos, las bacterias enfrentan variadas fuentes de estrés, tanto en el ambiente como durante su ciclo intracelular en los hospederos. Estas condiciones estresantes pueden desatar mecanismos de adaptación que modifican el perfil de resistencia de las cepas. Por ejemplo, se ha documentado que la exposición a agentes

que afectan la pared celular bacteriana, activa mecanismos de adaptación que resultan en resistencia contra betalactámicos y polimixinas.⁽¹⁵¹⁾ En el presente trabajo se observó que la probabilidad de que las cepas tuvieran un fenotipo MDR era más alta cuando portaban el gen de resistencia contra amonio cuaternario (*qacEDelta1*), una sustancia que daña la membrana celular. Probablemente, el frecuente uso del amonio cuaternario en la industria de alimentos sea un factor que condicione la co-selección de resistencia a biocidas y a antibióticos, un área que requiere de mayor investigación.

CONCLUSIONES Y CONTRIBUCIÓN GLOBAL DEL PROYECTO

El presente trabajo documenta la diseminación clonal y la persistencia de *Salmonella* no tifoidea, asociada con animales aparentemente sanos, a lo largo de la cadena productiva. La mayor parte de estas cepas posee un repertorio conservado de genes de virulencia, lo que representa un riesgo en términos de inocuidad de alimentos y de salud pública. Asimismo, se documenta el papel de las cepas de origen no clínico como reservorios de variabilidad genética en el ambiente, lo que influye en las características de *Salmonella* como un patógeno transmitido por alimentos.

Por otra parte, los perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia a antimicrobianos que se observaron evidencian la importancia de los bovinos de carne como reservorio de genes de resistencia de importancia en la medicina humana. Además, los análisis de genómica aquí realizados identifican la producción animal como un factor que contribuye a la emergencia y a la diseminación de cepas de *Salmonella* MDR. Por ello, resulta vital mantener una vigilancia sistemática de la RAM en las poblaciones de *Salmonella* asociadas con animales aparentemente sanos.

Las investigaciones realizadas en el marco de este proyecto de doctorado proveen una amplia caracterización genómica de las cepas de *S. enterica* asociadas con ganado bovino. Es uno de los estudios genómicos más completos que se han realizado hasta la fecha en México y en muchos otros países. El trabajo aporta información relevante sobre genes de virulencia, islas de patogenicidad, toxinas, genes de resistencia, perfil de

plásmidos e integrones, características que pocas veces se abordan de manera simultánea en un mismo estudio.

Los resultados también aportan evidencias que sugieren que la producción intensiva de alimentos de origen animal, caracterizada por unidades de producción con una alta densidad de animales, manejados bajo prácticas cada vez más uniformes, podría favorecer la emergencia de cepas altamente adaptadas para persistir y diseminarse.

Por último, la observación de algunas diferencias genómicas entre las cepas, particularmente de las características más ampliamente distribuidas en la población bajo estudio (ej. toxinas tifoideas, T4SS), permite generar nuevas hipótesis de investigación, encaminadas a mejorar el conocimiento actual sobre la evolución y la supervivencia de *Salmonella* en diferentes especies de abasto.

REFERENCIAS

1. WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 [documento en internet]. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/. Consultado: Oct 5, 2018.
2. Rhoades, JR, Duffy, G, Koutsoumanis, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiol* 2009;26(4):357-376.
3. Loudon, BC, Haarmann, D, Han, J, Foley, SL, Lynne, AM. Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food animals in the U.S. *Food Research International* 2012;45(2):968-972.
4. Chaudhuri, RR, Morgan, E, Peters, SE, Pleasance, SJ, Hudson, DL, Davies, HM *et al.* Comprehensive assignment of roles for *Salmonella typhimurium* genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genet* 2013;9(4):e1003456.
5. Jacobsen, A, Hendriksen, RS, Aaresturp, FM, Ussery, DW, Friis, C. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microbial ecology* 2011;62(3):487-504.
6. Ayala, D, Nightingale, K, Narvaez-Bravo, C, Brashears, MM. Molecular Characterization of *Salmonella* from Beef Carcasses and Fecal Samples from an Integrated Feedlot and Abattoir in Mexico. *J Food Protect* 2017;80(12):1964-1972.
7. Thung, TY, Radu, S, Mahyudin, NA, Rukayadi, Y, Zakaria, Z, Mazlan, N *et al.* Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. *Frontiers in microbiology* 2017;8(2697).
8. Kovac, J, Cummings, KJ, Rodriguez-Rivera, LD, Carroll, LM, Thachil, A, Wiedmann, M. Temporal Genomic Phylogeny Reconstruction Indicates a Geospatial Transmission Path of *Salmonella* Cerro in the United States and a Clade-Specific Loss of Hydrogen Sulfide Production. *Frontiers in microbiology* 2017;8(737).

9. Haley, BJ, Kim, SW, Pettengill, J, Luo, Y, Karns, JS, Van Kessel, JA. Genomic and Evolutionary Analysis of Two *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Sequence Types Isolated from Bovine and Poultry Sources in North America. *PloS one* 2016;11(10):e0161225.
10. Hoffmann, S, Batz, MB, Morris, JG, Jr. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. *J Food Prot* 2012;75(7):1292-1302.
11. Brichta-Harhay, DM, Arthur, TM, Bosilevac, JM, Kalchayanand, N, Shackelford, SD, Wheeler, TL *et al.* Diversity of multidrug-resistant salmonella enterica strains associated with cattle at harvest in the United States. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(5):1783-1796.
12. Realpe-Quintero, M, Barba-Leon, J, Perez-Montano, JA, Pacheco-Gallardo, C, Gonzalez-Aguilar, D, Dominguez-Arias, RM *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *PeerJ* 2018;6(e5482).
13. Quesada, A, Reginatto, GA, Ruiz Español, A, Colantonio, LD, Burrone, MS. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 2016;33(1):32.
14. Reller, ME. in *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* 837-842.e832 (2018).
15. Bergan, T. Classification of Enterobacteriaceae. *Methods in Microbiology* 1984;14(1-41).
16. Tindall, BJ, Grimont, PA, Garrity, GM, Euzéby, JP. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2005;55(Pt 1):521-524.
17. Grimont, PAD, Weill, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars [documento en internet]. Disponible en: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>. Consultado: Oct 5, 2018.
18. Tran, QT, Gomez, G, Khare, S, Lawhon, SD, Raffatellu, M, Baumler, AJ *et al.* The *Salmonella enterica* serotype Typhi Vi capsular antigen is expressed after the bacterium enters the ileal mucosa. *Infection and immunity* 2010;78(1):527-535.
19. Salmon, DE, Smith, T. The bacterium of swine-plague. *Am Month Micr J* 1886;7(204-205).
20. Lamas, A, Miranda, JM, Regal, P, Vazquez, B, Franco, CM, Cepeda, A. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological research* 2018;206(60-73).
21. Vagene, AJ, Herbig, A, Campana, MG, Robles Garcia, NM, Warinner, C, Sabin, S *et al.* *Salmonella enterica* genomes from victims of a major sixteenth-century epidemic in Mexico. *Nat Ecol Evol* 2018;2(3):520-528.
22. Baumler, A, Fang, FC. Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(12):a010041.
23. Gal-Mor, O, Boyle, EC, Grassl, GA. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in microbiology* 2014;5(391).
24. Jackson, BR, Griffin, PM, Cole, D, Walsh, KA, Chai, SJ. Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food Commodities, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 2013;19(8):1239-1244.
25. Bayer, C, Bernad, H, Prager, R, Rabsch, W, Hiller, P, Malorny, B *et al.* An outbreak of *Salmonella* Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. *Euro Surveill* 2014;19(1):pii=20665.
26. Lynch, MF, Blanton, EM, Bulens, S, Polyak, C, Vojdani, J, Stevenson, J *et al.* Typhoid Fever in the United States, 1999-2006. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2009;302(8):859-865.
27. Wain, J, Hendriksen, RS, Mikoleit, ML, Keddy, KH, Ochiai, RL. Typhoid fever. *The Lancet* 2015;385(9973):1136-1145.

28. Meltzer, E, Schwartz, E. Enteric fever: a travel medicine oriented view. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23(5):432-437.
29. Buckle, GC, Walker, CL, Black, RE. Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. *J Glob Health* 2012;2(1):010401.
30. CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet 2015 Surveillance Report (Final Data). (2015). <<https://www.cdc.gov/foodnet/pdfs/FoodNet-Annual-Report-2015-508c.pdf>>.
31. EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):
32. Glynn, JR, Palmer, SR. Incubation Period, Severity of Disease, and Infecting Dose: Evidence from a Salmonella Outbreak. *American journal of epidemiology* 1992;136(11):1369-1377.
33. Ao, TT, Feasey, NA, Gordon, MA, Keddy, KH, Angulo, FJ, Crump, JA. Global burden of invasive nontyphoidal Salmonella disease, 2010(1). *Emerg Infect Dis* 2015;21(6):
34. Andino, A, Hanning, I. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *TheScientificWorldJournal* 2015;2015(520179).
35. EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991-4152.
36. Habing, GG, Manning, S, Bolin, C, Cui, Y, Rudrik, J, Dietrich, S *et al.* Within-Farm Changes in Dairy Farm-Associated Salmonella Subtypes and Comparison to Human Clinical Isolates in Michigan, 2000-2001 and 2009. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(17):5724-5735.
37. Gutiérrez-Cogco, L, Montiel-Vázquez, E, Aguilera-Pérez, P, González-Andrade, MC. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica Mex* 2000;42(6):490-495.
38. Zaidi, MB, Calva, JJ, Estrada-García, MT, León, V, Vázquez, G, Figueroa, G *et al.* Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis* 2008;14(3):429-435.
39. Gragg, SE, Loneragan, GH, Nightingale, KK, Brichta-Harhay, DM, Ruiz, H, Elder, JR *et al.* Substantial within-animal diversity of Salmonella isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at slaughter. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(15):4744-4750.
40. Koohmaraie, M, Scanga, JA, De La Zerda, MJ, Koohmaraie, B, Tapay, L, Beskhlebnyaya, V *et al.* Tracking the Sources of Salmonella in Ground Beef Produced from Nonfed Cattle. *J Food Protect* 2012;75(8):1464-1468.
41. Yin, M, Yang, B, Wu, Y, Wang, L, Wu, H, Zhang, T *et al.* Prevalence and characterization of Salmonella enterica serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China. *Food Control* 2016;64(165-172).
42. Kagambèga, A, Lienemann, T, Aulu, L, Traoré, AS, Barro, N, Siitonen, A *et al.* Prevalence and characterization of Salmonella enterica from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human Salmonella isolates. *BMC microbiology* 2013;13(1):1-9.
43. Rodriguez-Rivera, LD, Wright, EM, Siler, JD, Elton, M, Cummings, KJ, Warnick, LD *et al.* Subtype analysis of Salmonella isolated from subclinically infected dairy cattle and dairy farm environments reveals the presence of both human- and bovine-associated subtypes. *Vet Microbiol* 2014;170(3-4):307-316.
44. Cunha-Neto, AD, Carvalho, LA, Carvalho, RCT, Dos Prazeres Rodrigues, D, Mano, SB, Figueiredo, EES *et al.* Salmonella isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. *Poult Sci* 2018;97(4):1373-1381.
45. Harb, A, Habib, I, Mezal, EH, Kareem, HS, Laird, T, O'Dea, M *et al.* Occurrence, antimicrobial resistance and whole-genome sequencing analysis of Salmonella isolates from chicken

- carcasses imported into Iraq from four different countries. *Int J Food Microbiol* 2018;284(84-90).
46. FAOSTAT. Food Balance Sheets. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Statistics Division. [documento en internet]. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/download/FB/FBS/E>. Consultado: Sep 23, 2018.
 47. Lu, S, Killoran, PB, Riley, LW. Association of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis YafD with Resistance to Chicken Egg Albumen. *Infection and immunity* 2003;71(12):6734-6741.
 48. Coleman, M, Ebel, E, Golden, N, Hogue, A, Kadry, A, Kause, J *et al.* Risk Assessments of *Salmonella* Enteritidis in Shell Eggs and *Salmonella* spp. in Egg Products. (2005). <https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SE_Risk_Assess_Oct2005.pdf>.
 49. Narvaez-Bravo, C, Miller, MF, Jackson, T, Jackson, S, Rodas-Gonzalez, A, Pond, K *et al.* *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot and Harvest Plant in Mexico. *J Food Prot* 2013;76(5):786-795.
 50. Dargatz, DA, Koprak, CA, Erdman, MM, Fedorka-Cray, PJ. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Cattle Feces in United States Feedlots in 2011. *Foodborne Pathog Dis* 2016;13(9):483-489.
 51. Eguale, T, Engidawork, E, Gebreyes, WA, Asrat, D, Alemayehu, H, Medhin, G *et al.* Fecal prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of *Salmonellae* in dairy cattle in central Ethiopia. *BMC microbiology* 2016;16(20).
 52. Narvaez-Bravo, C, Rodas-Gonzalez, A, Fuenmayor, Y, Flores-Rondon, C, Carruyo, G, Moreno, M *et al.* *Salmonella* on feces, hides and carcasses in beef slaughter facilities in Venezuela. *Int J Food Microbiol* 2013;166(2):226-230.
 53. Brichta-Harhay, DM, Arthur, TM, Bosilevac, JM, Kalchayanand, N, Schmidt, JW, Wang, R *et al.* Microbiological analysis of bovine lymph nodes for the detection of *Salmonella enterica*. *J Food Prot* 2012;75(5):854-858.
 54. Webb, HE, Brichta-Harhay, DM, Brashears, MM, Nightingale, KK, Arthur, TM, Bosilevac, JM *et al.* *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. *Frontiers in microbiology* 2017;8(2214).
 55. Hernández-San Juan, S, Zúñiga-Estrada, A, Sánchez-Ortega, I, Castro-Rosas, J, Román-Gutiérrez, AD, Santos-López, EM. Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal del estado de Hidalgo, México. *Vet Mex* 2007;38(2):187-194.
 56. Perez-Montaño, JA, González-Aguilar, D, Barba, J, Pacheco-Gallardo, C, Campos-Bravo, CA, García, S *et al.* Frequency and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serotypes on Beef Carcasses at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* 2012;75(5):867-873.
 57. Sandt, CH, Fedorka-Cray, PJ, Tewari, D, Ostroff, S, Joyce, K, M'ikanatha N, M. A comparison of non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility patterns. *PloS one* 2013;8(10):e77836.
 58. Bohaychuk, VM, Gensler, GE, Romero Barrios, P. Microbiological baseline study of beef and pork carcasses from provincially inspected abattoirs in Alberta, Canada. *Can Vet J* 2011;52(1095-1100).
 59. Khen, BK, Lynch, OA, Carroll, J, McDowell, DA, Duffy, G. Prevalence and characteristics of *Salmonella* in the beef chain in the Republic of Ireland. *Zoonoses and public health* 2014;61(8):534-536.
 60. Cabrera-Díaz, E, Barbosa-Cardenas, CM, Perez-Montano, JA, Gonzalez-Aguilar, D, Pacheco-Gallardo, C, Barba, J. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of salmonella in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *J Food Prot* 2013;76(12):2004-2010.
 61. Ballesteros-Nova, N, Rubio-Lozano, MS, Delgado-Suárez, EJ, Méndez-Medina, RD, Braña-Varela, D, Rodas Suárez, O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos *Salmonella*

- spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Publica México* 2016;58(3):1-7.
62. Spector, MP, Kenyon, WJ. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* 2012;45(2):455-481.
 63. Álvarez-Ordóñez, A, Prieto, M, Bernardo, A, Hill, C, López, M. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International* 2012;45(2):482-492.
 64. Stecher, B, Hapfelmeier, S, Muller, C, Kremer, M, Stallmach, T, Hardt, WD. Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infection and immunity* 2004;72(7):4138-4150.
 65. Yue, M, Han, X, De Masi, L, Zhu, C, Ma, X, Zhang, J *et al.* Allelic variation contributes to bacterial host specificity. *Nat Commun* 2015;6(8754).
 66. Kline, KA, Falker, S, Dahlberg, S, Normark, S, Henriques-Normark, B. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 2009;5(6):580-592.
 67. Guiney, DG, Fierer, J. The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Frontiers in microbiology* 2011;2(129).
 68. Rychlik, I, Gregorova, D, Hradecka, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 2006;112(1):1-10.
 69. Galdino, VMCA, Melo, RT, Oliveira, RP, Mendonça, EP, Navevaiko, PC, Rossi, DA. Virulence of *Salmonella* spp. of poultry products origin and antimicrobial resistance. *Bioscience Journal* 2013;29(4):932-939.
 70. Duffy, LL, Dykes, GA, Fegan, N. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia. *Food Research International* 2012;45(2):770-779.
 71. Brzuszkiewicz, E, Bruggemann, H, Liesegang, H, Emmerth, M, Olschlager, T, Nagy, G *et al.* How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(34):12879-12884.
 72. Costa, TR, Felisberto-Rodrigues, C, Meir, A, Prevost, MS, Redzej, A, Trokter, M *et al.* Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 2015;13(6):343-359.
 73. Chen, L, Zheng, D, Liu, B, Yang, J, Jin, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D694-697.
 74. Figueroa, OI, Verdugo, RA. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2005;47(1-2):
 75. Ramos-Morales, F. Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biology* 2012;2012(1-36).
 76. Park, D, Lara-Tejero, M, Waxham, MN, Li, W, Hu, B, Galan, JE *et al.* Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella*-host cell interface using cryo-electron tomography. *Elife* 2018;7(
 77. Fabrega, A, Vila, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(2):308-341.
 78. Baumberg, AJ, Winter, SE, Thiennimitr, P, Casadesus, J. Intestinal and chronic infections: *Salmonella* lifestyles in hostile environments. *Environ Microbiol Rep* 2011;3(5):508-517.
 79. Ackermann, M, Stecher, B, Freed, NE, Songhet, P, Hardt, WD, Doebeli, M. Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* 2008;454(7207):987-990.
 80. Stecher, B, Robbiani, R, Walker, AW, Westendorf, AM, Barthel, M, Kremer, M *et al.* *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007;5(10):2177-2189.
 81. Barman, M, Unold, D, Shifley, K, Amir, E, Hung, K, Bos, N *et al.* Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infection and immunity* 2008;76(3):907-915.

82. Voth, DE, Broederdorf, LJ, Graham, JG. Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol* 2012;7(2):241-257.
83. Gokulan, K, Khare, S, Rooney, AW, Han, J, Lynne, AM, Foley, SL. Impact of Plasmids, Including Those Encoding VirB4/D4 Type IV Secretion Systems, on *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Virulence in Macrophages and Epithelial Cells. *PloS one* 2013;8(10):e77866.
84. Rosselin, M, Virlogeux-Payant, I, Roy, C, Bottreau, E, Sizaret, PY, Mijouin, L *et al.* Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar *enteritidis*, mediates zipper-like internalization. *Cell Res* 2010;20(6):647-664.
85. Guo, A, Lasaro, MA, Sirard, JC, Kraehenbuhl, JP, Schifferli, DM. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by dendritic cells. *Microbiology* 2007;153(Pt 4):1059-1069.
86. McWhorter, AR, Chousalkar, KK. Comparative phenotypic and genotypic virulence of *Salmonella* strains isolated from Australian layer farms. *Frontiers in microbiology* 2015;6(12).
87. Dhanani, AS, Block, G, Dewar, K, Forgetta, V, Topp, E, Beiko, RG *et al.* Genomic Comparison of Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars *Typhimurium*, *Enteritidis*, *Heidelberg*, *Hadar* and *Kentucky* Isolates from Broiler Chickens. *PloS one* 2015;10(6):e0128773.
88. Ginocchio, CC, Rahn, K, Clarke, RC, Galán, JE. Naturally Occurring Deletions in the Centisome 63 Pathogenicity Island of Environmental Isolates of *Salmonella* spp. *Infection and immunity* 1997;65(4):1267-1272.
89. Becker, D, Selbach, M, Rollenhagen, C, Ballmaier, M, Meyer, TF, Mann, M *et al.* Robust *Salmonella* metabolism limits possibilities for new antimicrobials. *Nature* 2006;440(7082):303-307.
90. Ohi, ME, Miller, SI. *SALMONELLA: A Model for Bacterial Pathogenesis*. *Annu Rev Med* 2001;52(259-274).
91. Winter, SE, Thiennimitr, P, Winter, MG, Butler, BP, Huseby, DL, Crawford, RW *et al.* Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 2010;467(7314):426-429.
92. Mastroeni, P, Menager, N. Development of acquired immunity to *Salmonella*. *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 6):453-459.
93. Arthur, G, Nduba, VN, M., KS, Kimari, J, Bhatt, SM, Gilks, F. Trends in Bloodstream Infections among Human Immunodeficiency Virus–Infected Adults Admitted to a Hospital in Nairobi, Kenya, during the Last Decade. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;33(248-256).
94. Ahmed, AM, Shimamoto, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int J Food Microbiol* 2014;168-169(57-62).
95. Rajtak, U, Boland, F, Leonard, N, Bolton, D, Fanning, S. Roles of diet and the acid tolerance response in survival of common *Salmonella* serotypes in feces of finishing pigs. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(1):110-119.
96. Gonzalez-Escobedo, G, Marshall, JM, Gunn, JS. Chronic and acute infection of the gall bladder by *Salmonella* Typhi: understanding the carrier state. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(1):9-14.
97. Berriman, AD, Clancy, D, Clough, HE, Armstrong, D, Christley, RM. Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *Salmonella* in UK pig herds. *PloS one* 2013;8(6):e66054.
98. Verbrugghe, E, Dhaenens, M, Leyman, B, Boyen, F, Shearer, N, Van Parys, A *et al.* Host Stress Drives *Salmonella* Recrudescence. *Sci Rep* 2016;6(20849).

99. Rodriguez-Rivera, L, Moreno Switt, AI, Degoricija, L, Fang, R, Cummings, CA, Furtado, MR *et al.* Genomic characterization of *Salmonella* Cerro ST367, an emerging *Salmonella* subtype in cattle in the United States. *BMC Genomics* 2014;15(427).
100. Amavisit, P, Lightfoot, D, Browning, GF, Markham, PF. Variation between Pathogenic Serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *Journal of Bacteriology* 2003;185(12):3624-3635.
101. Barat, S, Steeb, B, Mazé, A, Bumann, D. Extensive In Vivo Resilience of Persistent *Salmonella*. *PloS one* 2012;7(7):e42007.
102. Dougan, G, Baker, S. *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu Rev Microbiol* 2014;68(317-336).
103. Vazquez-Torres, A. Less Is Best in the Convergent Evolution of Typhoidal *Salmonella*. *Cell Host Microbe* 2018;23(2):151-153.
104. Lawley, TD, Chan, K, Thompson, LJ, Kim, CC, Govoni, GR, Monack, DM. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS pathogens* 2006;2(2):e11.
105. Gopinath, S, Carden, S, Monack, D. Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends in microbiology* 2012;20(7):320-327.
106. Chong, A, Lee, S, Yang, Y, Song, J. The role of typhoid toxin in *Salmonella* Typhi virulence. *Yale Journal of Biology and Medicine* 2017;90(283-290).
107. Fowler, CC, Chang, SJ, Gao, X, Geiger, T, Stack, G, Galan, JE. Emerging insights into the biology of typhoid toxin. *Current opinion in microbiology* 2017;35(70-77).
108. Spano, S, Ugalde, JE, Galan, JE. Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 2008;3(1):30-38.
109. Lara-Tejero, M, Galán, JE. Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in microbiology* 2002;10(3):147-152.
110. Locht, C, Coutte, L, Mielcarek, N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* 2011;278(23):4668-4682.
111. Guerra, L, Cortes-Bratti, X, Guidi, R, Frisan, T. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins (Basel)* 2011;3(3):172-190.
112. Lara-Tejero, M, Galán, JE. A Bacterial Toxin That Controls Cell Cycle Progression as a Deoxyribonuclease I-Like Protein. *Science* 2000;290(5490):354.
113. Song, J, Gao, X, Galan, JE. Structure and function of the *Salmonella* Typhi chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. *Nature* 2013;499(7458):350-354.
114. Deng, L, Song, J, Gao, X, Wang, J, Yu, H, Chen, X *et al.* Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen *Salmonella* Typhi. *Cell* 2014;159(6):1290-1299.
115. Rodriguez-Rivera, LD, Bowen, BM, den Bakker, HC, Duhamel, GE, Wiedmann, M. Characterization of the cytolethal distending toxin (typhoid toxin) in non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Gut pathogens* 2015;7(19).
116. Miller, RA, Wiedmann, M. The Cytolethal Distending Toxin Produced by Nontyphoidal *Salmonella* Serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi Induces DNA Damage in a Manner Similar to That of Serotype Typhi. *MBio* 2016;7(6):
117. Del Bel Belluz, L, Guidi, R, Pateras, IS, Levi, L, Mihaljevic, B, Rouf, SF *et al.* The Typhoid Toxin Promotes Host Survival and the Establishment of a Persistent Asymptomatic Infection. *PLoS pathogens* 2016;12(4):e1005528.
118. Suez, J, Porwollik, S, Dagan, A, Marzel, A, Schorr, YI, Desai, PT *et al.* Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PloS one* 2013;8(3):e58449.
119. Yoon, SH, Park, YK, Kim, JF. PAIDB v2.0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Res* 2015;43(Database issue):D624-630.
120. Marcus, SL, Brumell, JH, Pfeifer, CG, Finlay, BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection* 2000;2(2):145-156.

121. Hensel, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 2004;294(2-3):95-102.
122. Gerlach, RG, Jäckel, D, Stecher, B, Wagner, C, Lupas, A, Hardt, W-D *et al.* *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular Microbiology* 2007;9(7):1834-1850.
123. Faucher, SP, Forest, C, Beland, M, Daigle, F. A novel PhoP-regulated locus encoding the cytolysin ClyA and the secreted invasin TaiA of *Salmonella enterica* serovar Typhi is involved in virulence. *Microbiology* 2009;155(Pt 2):477-488.
124. Petkau, A, Stuart-Edwards, M, Stothard, P, Van Domselaar, G. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics* 2010;26(24):3125-3126.
125. den Hartigh, AB, Sun, YH, Sondervan, D, Heuvelmans, N, Reinders, MO, Ficht, TA *et al.* Differential requirements for VirB1 and VirB2 during *Brucella abortus* infection. *Infection and immunity* 2004;72(9):5143-5149.
126. Hoffmann, M, Zhao, S, Pettengill, J, Luo, Y, Monday, SR, Abbott, J *et al.* Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *salmonella enterica* serotype heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. *Genome Biol Evol* 2014;6(5):1046-1068.
127. WHO. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>. Accessed 31 October 2018.
128. WHO. WHO list of critically important antimicrobials for human medicine 5th revision. (2017). <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>.
129. Amábile-Cuevas, CF. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries* 2010;4(3):126-131.
130. Antunes, P, Machado, J, Peixe, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2006;58(2):297-304.
131. Talbot, EA, Gagnon, ER, Greenblatt, J. Common Ground for the Control of Multidrug-Resistant *Salmonella* in Ground Beef. *Clinical Infectious Disease* 2006;42(1455-1462).
132. OECD. Antimicrobial resistance. Policy insights. (2016). <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Policy-Insights-November2016.pdf>.
133. Santiago, ML, Espinosa, A, Bermúdez, MC. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2009;40(3):22-32.
134. SAGARPA. Productos químico-farmacéuticos vigentes 2017 [documento en internet]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/regulacion-de-productos-veterinarios>. Consultado: 5 October 2018.
135. SAGARPA. ACUERDO por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos [documento en internet]. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/acuerdos-referentes-a-103631>. Consultado: 31 Octubre 2018.
136. Oliynyk, M, Samborsky, M, Lester, JB, Mironenko, T, Scott, N, Dickens, S *et al.* Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol* 2007;25(4):447-453.
137. Allen, HK, Donato, J, Wang, HH, Cloud-Hansen, KA, Davies, J, Handelsman, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(4):251-259.
138. Mazel, D, Davies, J. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci* 1999;56(742-754).
139. Cox, G, Wright, GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013;303(6-7):287-292.

140. K. Sharma, S, Dai, T, B. Kharkwal, G, Huang, Y-Y, Huang, L, J. Bil De Arce, V *et al.* Drug Discovery of Antimicrobial Photosensitizers Using Animal Models. *Current Pharmaceutical Design* 2011;17(13):1303-1319.
141. Blair, JMA, Webber, MA, Baylay, AJ, Ogbolu, DO, Piddock, LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2014;13(1):42-51.
142. Du, D, Wang-Kan, X, Neuberger, A, van Veen, HW, Pos, KM, Piddock, LJV *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(9):523-539.
143. Piddock, LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):382-402.
144. Piddock, LJ. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(8):626-636.
145. Bogomolnaya, LM, Andrews, KD, Talamantes, M, Maple, A, Ragoza, Y, Vazquez-Torres, A *et al.* The ABC-Type Efflux Pump MacAB Protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Oxidative Stress. *mBio* 2013;4(6):
146. Webber, MA, Bailey, AM, Blair, JMA, Morgan, E, Stevens, MP, Hinton, JCD *et al.* The Global Consequence of Disruption of the AcrAB-TolC Efflux Pump in *Salmonella enterica* Includes Reduced Expression of SPI-1 and Other Attributes Required To Infect the Host. *Journal of Bacteriology* 2009;191(13):4276-4285.
147. Buckley, AM, Webber, MA, Cooles, S, Randall, LP, La Ragione, RM, Woodward, MJ *et al.* The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cellular Microbiology* 2006;8(5):847-856.
148. Zankari, E, Allesoe, R, Joensen, KG, Cavaco, LM, Lund, O, Aarestrup, FM. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2017;72(10):2764-2768.
149. Hopkins, KL, Davies, RH, Threlfall, EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(5):358-373.
150. Quesada, A, Porrero, MC, Tellez, S, Palomo, G, Garcia, M, Dominguez, L. Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2015;70(1):71-74.
151. Poole, K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012;67(9):2069-2089.
152. von Wintersdorff, CJ, Penders, J, van Niekerk, JM, Mills, ND, Majumder, S, van Alphen, LB *et al.* Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in microbiology* 2016;7(173).
153. Norman, A, Hansen, LH, Sorensen, SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364(1527):2275-2289.
154. Huddleston, JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist* 2014;7(167-176).
155. Lujan, SA, Guogas, LM, Ragonese, H, Matson, SW, Redinbo, MR. Disrupting antibiotic resistance propagation by inhibiting the conjugative DNA relaxase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(30):12282-12287.
156. Williams, JJ, Hergenrother, PJ. Exposing plasmids as the Achilles' heel of drug-resistant bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(4):389-399.
157. Gillings, MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78(2):257-277.
158. Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006;4(8):608-620.
159. Carattoli, A, Zankari, E, García-Fernández, A, Larsen, MV, Lund, O, Villa, L *et al.* In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014;58(7):3895-3903.

160. Hur, J, Jawale, C, Lee, JH. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. *Food Research International* 2012;45(2):819-830.
161. Foley, SL, Lynne, AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci* 2008;86(14 Suppl):E173-187.
162. Carattoli, A. Animal reservoirs for extended spectrum b-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl. 1):117-123.
163. Bush, K, Jacoby, GA, Medeiros, AA. A Functional Classification Scheme for b-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1211-1233.
164. FDA. Global Salmonella Resistome Data [documento en internet]. Disponible en: <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm570694.htm>. Consultado: 30 Octubre 2018.
165. Nüesch-Inderbinen, M, Stephan, R. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in the Human-Livestock Environment. *Current Clinical Microbiology Reports* 2016;3(1):1-9.
166. Jia, B, Raphenya, AR, Alcock, B, Waglechner, N, Guo, P, Tsang, KK *et al.* CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D566-D573.
167. Hansen, DLH, Sørensen, SJ, Jørgensen, HS, Jensen, LB. The Prevalence of the OqxAB Multidrug Efflux Pump amongst Olaquinox-Resistant *Escherichia coli* in Pigs. 2005;11(4):378-382.
168. Poirel, L, Rodriguez-Martinez, JM, Mammeri, H, Liard, A, Nordmann, P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3523-3525.
169. Strahilevitz, J, Jacoby, GA, Hooper, DC, Robicsek, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):664-689.
170. Karczmarczyk, M, Martins, M, McCusker, M, Mattar, S, Amaral, L, Leonard, N *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a qnrB19-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS Microbiol Lett* 2010;313(1):10-19.
171. Lin, D, Chen, K, Wai-Chi Chan, E, Chen, S. Increasing prevalence of ciprofloxacin-resistant food-borne *Salmonella* strains harboring multiple PMQR elements but not target gene mutations. *Sci Rep* 2015;5(14754).
172. Zankari, E, Hasman, H, Cosentino, S, Vestergaard, M, Rasmussen, S, Lund, O *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012;67(11):2640-2644.
173. Sangal, V, Harbottle, H, Mazzoni, CJ, Helmuth, R, Guerra, B, Didelot, X *et al.* Evolution and population structure of *Salmonella enterica* serovar Newport. *J Bacteriol* 2010;192(24):6465-6476.
174. Stamatakis, A, Hoover, P, Rougemont, J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol* 2008;57(5):758-771.
175. Zhang, S, Yin, Y, Jones, MB, Zhang, Z, Deatherage Kaiser, BL, Dinsmore, BA *et al.* *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of clinical microbiology* 2015;53(5):1685-1692.
176. Bäumler, AJ, Tsolis, RM, Heffron, F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996;93(279-283).
177. Fang, FC, DeGroot, MA, Foster, JW, Bäumler, AJ, Ochsner, U, Testerman, T *et al.* Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999;96(7502-7507).

178. Uzzau, S, Bossi, L, Figueroa-Bossi, N. Differential accumulation of Salmonella [Cu, Zn] superoxide dismutases SodCI and SodCII in intracellular bacteria: correlation with their relative contribution to pathogenicity. *Molecular microbiology* 2002;46(1):147-156.
179. Ashida, H, Ogawa, M, Kim, M, Mimuro, H, Sasakawa, C. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nat Chem Biol* 2011;8(1):36-45.
180. Marchler-Bauer, A, Bo, Y, Han, L, He, J, Lanczycki, CJ, Lu, S *et al.* CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res* 2017;45(D1):D200-D203.
181. den Bakker, HC, Moreno Switt, AI, Govoni, G, Cummings, CA, Ranieri, ML, Degoricija, L *et al.* Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC Genomics* 2011;12(425).
182. Mezal, EH, Bae, D, Khan, AA. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. *Pathog Dis* 2014;72(2):95-103.
183. Ronquist, F, Teslenko, M, van der Mark, P, Ayres, DL, Darling, A, Höhna, S *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 2012;61(3):539-542.
184. Blanc-Potard, AB, Solomon, F, Kayser, J, Groisman, EA. The SPI-3 Pathogenicity Island of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 1999;181(3):998-1004.
185. Morgan, E, Campbell, JD, Rowe, SC, Bispham, J, Stevens, MP, Bowen, AJ *et al.* Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 2004;54(4):994-1010.
186. Figueiredo, R, Card, R, Nunes, C, AbuOun, M, Bagnall, MC, Nunez, J *et al.* Virulence Characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium*. *PloS one* 2015;10(8):e0135010.
187. Shintani, M, Sanchez, ZK, Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology* 2015;6(242).
188. Lopez-Alonso, M. Trace minerals and livestock: not too much not too little. *ISRN Vet Sci* 2012;2012(704825).
189. Amachawadi, RG, Scott, HM, Alvarado, CA, Mainini, TR, Vinasco, J, Drouillard, JS *et al.* Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Appl Environ Microbiol* 2013;79(14):4369-4375.
190. Zhou, B, Wang, C, Zhao, Q, Wang, Y, Huo, M, Wang, J *et al.* Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms. *Journal of hazardous materials* 2016;320(10-17).
191. De la Garza, J. Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en tres etapas de la cadena productiva de carne de bovino (tesis). TESIUNAM: Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
192. Rahn, K, De Grandis, SA, Clarke, RC, Curtiss, R, Gyles, CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and cellular probes* 1992;6(271-279).
193. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [documento en internet]. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Consultado:
194. Bolger, AM, Lohse, M, Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 2014;btu170(
195. Wattam, AR, Abraham, D, Dalay, O, Disz, TL, Driscoll, T, Gabbard, JL *et al.* PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Research* 2014;42(D1):D581-D591.

196. Bankevich, A, Nurk, S, Antipov, D, Gurevich, AA, Dvorkin, M, Kulikov, AS *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 2012;19(5):455-477.
197. Aziz, RK, Bartels, D, Best, AA, DeJongh, M, Disz, T, Edwards, RA *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 2008;9(75).
198. Overbeek, R, Olson, R, Pusch, GD, Olsen, GJ, Davis, JJ, Disz, T *et al.* The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research* 2014;42(D206-D214).
199. Kaas, RS, Leekitcharoenphon, P, Aarestrup, FM, Lund, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PloS one* 2014;9(8):e104984.
200. Miller, MA, Pfeiffer, W, Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8. 2010;
201. Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 1997;25(3389-3402).
202. Carver, TJ, Rutherford, KM, Berriman, M, Rajandream, MA, Barrell, BG, Parkhill, J. ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics* 2005;21(16):3422-3423.
203. Alikhan, NF, Petty, NK, Ben Zakour, NL, Beatson, SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 2011;12(402).
204. Gouy, M, Guindon, S, Gascuel, O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* 2010;27(2):221-224.
205. Sievers, F, Wilm, A, Dineen, D, Gibson, TJ, Karplus, K, Li, W *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011;7(539).
206. Castresana, J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution* 2000;17(4):540-552.
207. McEwen, SA, Fedorka-Cray, PJ. Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2002;34 (Suppl 3)(S93-S106).
208. Qiu, H, Gong, J, Butaye, P, Lu, G, Huang, K, Zhu, G *et al.* CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification confirms the cause-effect relationship between *gyrA* mutation and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2018;365(13):
209. Chang, HH, Cohen, T, Grad, YH, Hanage, WP, O'Brien, TF, Lipsitch, M. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2015;79(1):101-116.
210. An, R, Alshalchi, S, Breimhurst, P, Munoz-Aguayo, J, Flores-Figueroa, C, Vidovic, S. Strong influence of livestock environments on the emergence and dissemination of distinct multidrug-resistant phenotypes among the population of non-typhoidal *Salmonella*. *PloS one* 2017;12(6):e0179005.
211. Kalambhe, DG, Zade, NN, Chaudhari, SP, Shinde, SV, Khan, W, Patil, AR. Isolation, antibiogram and pathogenicity of *Salmonella* spp. recovered from slaughtered food animals in Nagpur region of Central India. *Vet World* 2016;9(2):176-181.
212. Schmidt, JW, Agga, GE, Bosilevac, JM, Brichta-Harhay, DM, Shackelford, SD, Wang, R *et al.* Occurrence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the Beef Cattle Production and Processing Continuum. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(2):713-725.
213. Delgado-Suarez, EJ, Selem-Mojica, N, Ortiz-Lopez, R, Gebreyes, WA, Allard, MW, Barona-Gomez, F *et al.* Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal

- toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal Salmonella. *Sci Rep* 2018;8(1):9864.
214. Bauer, AW, Kirby, WM, Sherris, JC, Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45(4):493-496.
 215. CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012. Accessed
 216. Sibhat, B, Molla Zewde, B, Zerihun, A, Muckle, A, Cole, L, Boerlin, P *et al*. Salmonella serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in Ethiopia. *Zoonoses and public health* 2011;58(2):102-109.
 217. Van, TT, Nguyen, HN, Smooker, PM, Coloe, PJ. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal Salmonella enterica isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int J Food Microbiol* 2012;154(3):98-106.
 218. Junod, T, López-Martín, J, Gädicke, P. Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario. *Rev Med Chile* 2013;141(298-304).
 219. Varela-Guerrero, JA, Talavera-Rojas, M, Gutierrez-Castillo Adel, C, Reyes-Rodriguez, NE, Vazquez-Guadarrama, J. Phenotypic-genotypic resistance in Salmonella spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod* 2013;45(4):995-1000.
 220. Mir, RA, Weppelmann, TA, Johnson, JA, Archer, D, Morris, JG, Jr., Jeong, KC. Identification and Characterization of Cefotaxime Resistant Bacteria in Beef Cattle. *PloS one* 2016;11(9):e0163279.
 221. Meng, H, Zhang, Z, Chen, M, Su, Y, Li, L, Miyoshi, S *et al*. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in Salmonella strains isolated from food products of animal origin. *Int J Food Microbiol* 2011;149(3):274-277.
 222. Edgar, R, Bibi, E. MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J Bacteriol* 1997;179(7):2274-2280.
 223. Swick, MC, Morgan-Linnell, SK, Carlson, KM, Zechiedrich, L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in Escherichia coli clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(2):921-924.
 224. Baron, S, Hadjadj, L, Rolain, JM, Olaitan, AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents* 2016;48(6):583-591.
 225. Parkhill, J, Dougan, G, James, KD, Thomson, NR, Pickard, D, Wain, J *et al*. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. *Nature* 2001;413(848-852).
 226. McClelland, M, Sanderson, KE, Spieth, J, Clifton, SW, Latreille, P, Courtney, L *et al*. Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature* 2001;413(852-856).
 227. Achtman, M, Wain, J, Weill, FX, Nair, S, Zhou, Z, Sangal, V *et al*. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in Salmonella enterica. *PLoS pathogens* 2012;8(6):e1002776.
 228. Mendoza Mdel, C, Herrero, A, Rodicio, MR. [Evolutionary engineering in Salmonella: emergence of hybrid virulence-resistance plasmids in non-typhoid serotypes]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 2009;27(1):37-43.
 229. Yamaguchi, Y, Inouye, M. Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin-antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(11):779-790.

ANEXO. ARTÍCULOS RELACIONADOS CON LA TESIS DE DOCTORADO

1. Ballesteros-Nova, N, Rubio-Lozano, MS, Delgado-Suárez, EJ, Méndez-Medina, RD, Braña-Varela, D, Rodas Suárez, O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos *Salmonella* spp. aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud Publica México* 2016;58(3):1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.21149/spm.v58i3.7897>.

2. De la Garza García JA, Rubio Lozano MS, Wachter Rodarte MC, Navarro Ocaña A, Hernández Castro R, Xicohtencatl Cortés J, Delgado Suárez EJ. 2019. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* asociadas con el proceso de matanza y deshuese de bovinos. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* (In Press).

Artículo relacionado No. 1. Ballesteros et al. 2016

PERFIL DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE SEROTIPOS DE *Salmonella* spp. AISLADOS DE CARNE DE RES MOLIDA EN LA CIUDAD DE MÉXICO

ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF *Salmonella* spp. SEROTYPES ISOLATED FROM RETAIL BEEF IN MEXICO CITY

Título corto:

Antibiogramas de *Salmonella* spp.

Nayarit Ballesteros Nova, M en C, ⁽¹⁾ María Salud Rubio Lozano, D en C, ⁽¹⁾ Enrique Delgado Suarez, M en C, ⁽¹⁾ Danilo Méndez Medina, D en C, ⁽¹⁾ Diego Braña Varela, D en C. ⁽²⁾, Oscar Rodas Suárez, D en C ⁽³⁾

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 04510, México, D. F., México.

²ELANCO Animal Health-México

³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás, 11340, México, D. F., México.

Autor de correspondencia: **Enrique Jesús Delgado Suárez**. Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (**CEPIPSA**). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Cruz Blanca No. 486, San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, C.P. 14500 México, D.F. Correo electrónico: enriquedelgado.suarez@gmail.com

RESUMEN

Objetivo. Determinar serotipo y perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella* spp. presentes en la carne de res que se expende en la capital mexicana. **Materiales y métodos.** Se analizaron 100 muestras de carne molida. El patógeno fue aislado por métodos convencionales y confirmado por PCR (gen *InvA*, 284 pb). El perfil de resistencia a antibióticos se determinó por el método de Kirby-Bauer y la serotipificación por el esquema de Kauffman-White. **Resultados.** Se detectaron los serotipos Lomita (6), Derby (4), Senftenberg (2), Javiana y Cannstatt

(1). Se observó alta resistencia a ampicilina (18/19), carbenicilina (16/19), tetraciclina (13/19) y trimetoprim-sulfametoxazol (13/19). Cinco cepas fueron no tipificables y 14 mostraron multiresistencia. **Conclusiones.** La carne de res que se vende en el principal centro de consumo del país está contaminada con serotipos de *Salmonella* spp. relevantes para la salud pública. Una importante proporción de éstos es resistente a múltiples antibióticos.

Palabras clave: serotipos de *Salmonella*; carne de res; resistencia a antibióticos

ABSTRACT

Objective. To determine the serotype and antibiotic resistance profile of *Salmonella* spp. isolated from retail ground beef in Mexico City. **Materials and methods.** A total of 150 samples of ground beef were analyzed. The pathogen was isolated by conventional methods and confirmed by PCR (*invA* gene, 284 bp). The antibiotic resistance profile was determined by the Kirby-Bauer method while serotyping was performed according to the Kauffman-White scheme. **Results.** We isolated a total of 19 strains of Lomita (6), Derby (4), Senftenberg (2), Javiana and Cannstatt (1) and undetermined (5) serotypes. The strains showed a high resistance rate to ampicillin (18/19), carbenicillin (16/19), tetracyclin (13/19), and trimethoprim-sulfamethoxazole (13/19). Multi-drug resistance was observed in 14 isolates. **Conclusions.** Several *Salmonella* spp. serotypes of public health significance are circulating in ground beef sold in the major Mexican city. Some of these strains are multi-drug resistance.

Keywords: *Salmonella* serotypes; ground beef; multidrug resistance; Mexico

La salmonelosis transmitida por alimentos es una de las principales preocupaciones de salud pública a escala global.^{1,2,3} La carne de diferentes especies, entre ellas la de bovino, es un importante vehículo de transmisión de *Salmonella*,^{4,5,6} de la cual se han identificado más de 2500 serotipos,⁷ algunos de los cuales tienen predominancia en ciertas especies animales y/o zonas geográficas. Además, algunas cepas de este patógeno han mostrado una creciente resistencia a

antimicrobianos, lo que constituye un gigantesco desafío para las autoridades de salud. De ahí que la tipificación de aislamientos sea de gran utilidad para entender la epidemiología de este agente infeccioso y, por tanto, desarrollar medidas preventivas para minimizar los riesgos asociados con el mismo.

Desafortunadamente, la frecuencia con que se presentan determinados serotipos de *Salmonella* spp., así como su perfil de resistencia a antibióticos en distintas especies animales suele variar espacial y temporalmente.^{1,8} En México, las investigaciones más recientes en carne de res fueron realizadas entre cinco y trece años atrás.^{9,10,11,12,13} Por tanto, resulta necesario generar información reciente que contribuya a evaluar el riesgo a la salud pública derivado de la presencia de *Salmonella* spp. en carne de bovino, que es el segundo tipo de carne que más se consume en el país. Es por ello que se realiza el presente trabajo, que tiene por objetivo generar información sobre principales serotipos y perfil de resistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* spp. asociadas con la carne de res que se expende en la capital mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo no requirió de la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Lo anterior en virtud de que en el estudio no se emplearon animales de experimentación.

Diseño del Experimento

En este experimento se realizó un muestreo por conveniencia, en la Ciudad de México, D. F., por ser el principal centro de consumo del país y al que llega carne de varios estados de la república. La unidad muestral consistió en 100-200 gramos de carne molida de res, expedida en supermercados, carnicerías, mercados públicos y mercados sobre ruedas (tianguis).

Muestreo

Para determinar el número de lugares a muestrear, se utilizó la fórmula para determinar el tamaño de muestra para una proporción de una población, cuando no conocemos el número de elementos en esa población:¹⁴

$$n = Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot q / e^2 \text{ donde:}$$

n= tamaño de la muestra

$Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (ya que el nivel de confianza es del 95%).

p= proporción esperada (como no tenemos idea de dicha proporción, utilizamos el valor $p=0.5$ (50%) que maximiza el tamaño de muestra.

q= 1-p

e= precisión (en este caso se fijó en **10%**)

Con base en la fórmula anterior, el tamaño de muestra fue de 96, el cual se redondeó a 100. De éstas, la mitad se tomó en supermercados (n=50) e igual número en carnicerías, mercados públicos y tianguis. Los supermercados pertenecen a las principales cadenas de tiendas que conforman los sistemas de distribución formal de carne refrigerada.¹⁵ A su vez, los mercados públicos, mercados sobre ruedas (tianguis) y carnicerías hacen parte de los sistemas de distribución informal de carne caliente.¹⁵

Los lugares para la toma de muestras se seleccionaron al azar, utilizando números aleatorios generados en Microsoft *Excel*. En el caso de los supermercados, se seleccionaron cuatro cadenas comerciales pertenecientes a la ANTAD (Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales). El número de puntos de venta a muestrear por cadena comercial se determinó con base en la probabilidad proporcional al tamaño (número de tiendas) en cada una de estas. Los lugares para la toma de muestras también fueron escogidos al azar. El muestreo se llevó a cabo entre abril y noviembre de 2013. Las muestras se colocaron en hieleras con geles refrigerantes para su transporte al laboratorio (2-4 °C) y fueron procesadas dentro de las siguientes **4** horas.

Análisis microbiológico

Para la preparación de las muestras se siguió el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994,¹⁶ que describe la preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Asimismo, el aislamiento microbiológico se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994,¹⁷ según el cual se deben seguir los pasos de pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento selectivo diferencial e identificación bioquímica.

Confirmación molecular

Para la confirmación molecular de la *Salmonella*, se determinó la presencia del gen *invA* (284 pb), característico de *Salmonella* spp. y relacionado con su capacidad invasiva. Se usaron iniciadores específicos para *Salmonella*, utilizados anteriormente por Rahn y colaboradores.¹⁸ La reacción con estos iniciadores fue llevada a cabo en 2.5 µL de buffer 10X para PCR (500 mM KCL, 200 Mm Tris HCL), 1.25 µL de dNTPs (10Mm), 1.6 µL de MgCl₂, 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (Fermentas) y 1.5 µL de la extracción de cada aislado. La PCR se corrió bajo las siguientes condiciones: incubación inicial a 94°C por 60 segundos; seguida por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 segundos; alineación a 64°C por 30 segundos; finalmente una amplificación a 72°C por 30 segundos, seguida de un periodo de extensión final de 7 minutos a 72°C. La amplificación de los productos de PCR fue analizada usando geles con 1.2% de agarosa, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con un transiluminador.

Serotipificación

La serotipificación se realizó de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White,⁷ para lo cual los aislamientos fueron enviados al Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) de la Secretaría de Salud.

Resistencia a antibióticos

Para determinar la sensibilidad de los aislamientos a antibióticos, se utilizó la prueba de difusión en discos (sensidiscos individuales BIO-RAD) mediante el Método de

Kirby-Bauer.¹⁹ Los resultados se reportaron de acuerdo con los criterios de interpretación propuestos por el CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute).²⁰ Se probaron 14 antibióticos: ampicilina (Am; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (Ax; 30 µg), amikacina (Ak; 30 µg), ceftriazona (Cro; 30 µg), cefalotina (Cf; 30 µg), cefotaxima (Ctx; 30 µg), cloranfenicol (Chl; 30 µg), pefloxacina (Pef; 5 µg), gentamicina (Ge; 10 µg), nitrofurantoína (Nf; 30 µg), netilmicina (Net; 30 µg), trimetoprim sulfametazol (Stx; 250 µg), carbenicilina (Cb; 100 µg) y tetraciclina (Tet; 30 µg). Se utilizaron como organismos de control de calidad: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Éstos fueron donados por el laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional de México. Las cepas fueron consideradas multirresistentes cuando fueron resistentes a tres grupos de antibióticos o más. Se utilizaron las herramientas de análisis de datos de Microsoft Excel para elaborar la estadística descriptiva. Para el análisis de la relación entre de la frecuencia de muestras positivas a *Salmonella* y los distintos puntos de venta, se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2), con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS

Se encontró una frecuencia relativa promedio de *Salmonella* spp. en carne de res molida del 16% en la muestra estudiada. No obstante, en los supermercados el porcentaje de muestras positivas fue del 6% (3/50); mientras que en el sector informal fue del 32% (16/50): 2 de tianguis, 4 de carnicerías y 10 de mercados públicos (Cuadro I). La prueba de Chi cuadrado evidenció que el porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp. estuvo asociado significativamente ($P < 0,05$) con el tipo de mercado (formal o informal) en el que se expende la carne.

Los serotipos predominantes fueron Lomita y Derby, aunque también se encontraron cepas de Senftenberg, Javiana y Cannstatt. Cinco de los aislamientos tuvieron resultados no concluyentes, por lo que se reportan como no serotificados. En materia de susceptibilidad a antibióticos (Cuadro II), las resistencias más frecuentes se presentaron en β -lactámicos; mientras que el 73.7% (14/19) de los

aislamientos resultaron multirresistentes. Como se muestra en la figura 1, entre 70 y 95% de las cepas presentaron resistencia a ampicilina (18/19), carbenicilina (16/19), tetraciclina (13/19) y trimetoprim-sulfametoxazol (13/19). En los demás antibióticos el porcentaje de cepas resistentes fue mucho más bajo (entre 5 y 30%).

DISCUSIÓN

Estudios previos en cortes de carne cruda⁹ y carne molida,²¹ reportan porcentajes de positividad a *Salmonella* spp. mucho mayores a los aquí observados. Sin embargo, estas diferencias no son necesariamente el reflejo de un mejor control del patógeno en fechas más recientes, pues se ha demostrado que su prevalencia en el ganado puede variar con la zona geográfica y con la época del año.²² En cualquier caso, la frecuencia relativa observada en este estudio dista mucho de ser baja, lo que indica que la carne bovina se mantiene como un vehículo potencial para la transmisión de *Salmonella* spp.

Se ha sugerido que la presencia de nódulos linfáticos, en los recortes y en la carne molida de res, podría ser una de las principales fuentes de contaminación con *Salmonella*.²³ Lo anterior a partir de la clonalidad observada entre cepas presentes en nódulos linfáticos y en carne cruda. Además, la alta prevalencia del patógeno (55-91%) que suele observarse en los nódulos linfáticos,^{22,24} los cuales son muy difíciles de eliminar por completo de la carne durante el faenado en los rastros, explica de manera plausible el hallazgo persistente de tasas de positividad a *Salmonella* spp. de moderadas a altas en muestras de carne cruda en punto de venta a lo largo de décadas.

Al parecer, para un mejor control de la diseminación de *Salmonella* a través de la carne de res será necesario estudiar los factores que expliquen la colonización de los nódulos linfáticos por esta bacteria en bovinos aparentemente sanos. Asimismo, el desarrollo de estrategias para reducir la contaminación de las canales con el contenido de los nódulos linfáticos, desde los rastros, podría ser un factor clave para la mitigación de este riesgo.

En adición a lo anterior, se requiere una mejor aplicación de la ley, específicamente en lo relativo al expendio de carne caliente. A pesar de que esta práctica está prohibida en la normatividad vigente,²⁵ es tolerada en todo el país. La prueba de Chi

cuadrado evidenció una asociación significativa de la frecuencia de positividad a *Salmonella* con el mercado informal, donde el porcentaje de muestras positivas fue casi seis veces superior en relación con los supermercados. Por tanto, es evidente el potencial para reducir el riesgo de diseminación del patógeno en la cadena de abasto, si tan solo se aplicaran de manera efectiva las medidas ya contempladas en la legislación vigente.

Con respecto a los serotipos, afortunadamente no se detectó ninguno de los de más alta virulencia (ej. Enteritidis y Typhimurium DT104). Sin embargo, todos los que se identificaron se han encontrado anteriormente en muestras de carne cruda y se han reconocido como causantes de infecciones transmitidas por alimentos en humanos en México y en otros países.^{6,26,27,28}

Aunque la distribución de serotipos de *Salmonella*, tanto en alimentos como en casos clínicos, suele ser muy variable,^{1,2,8,29} la predominancia de S. Lomita no coincide con estudios anteriores realizados en México,^{6,9,12,26,30} en los que se reportan frecuencias nulas de esta serovariedad, tanto en muestras clínicas como en alimentos. No obstante, se ha sugerido que el hallazgo de cepas que podrían considerarse “exóticas” en determinadas regiones, podría deberse a la globalización comercial y a la intensificación del turismo, los cuales favorecen la introducción e intercambio de distintos serotipos de *Salmonella* entre países.^{31,32}

Desafortunadamente, las muestras incluidas en el presente trabajo fueron tomadas sólo en punto de venta y en un corto período de tiempo (aproximadamente 8 meses). Estas limitaciones imposibilitan establecer las razones que condicionan el predominio de determinados serotipos. Tampoco se encontraron reportes previos de estudios similares en la Ciudad de México, que permitieran establecer comparaciones cronológicas. No obstante, resulta interesante analizar por qué S. Lomita, un serotipo asociado principalmente con las palomas,^{27,28} fue aislado sólo de muestras obtenidas en el mercado informal. Los expendios informales tienen en común el pobre manejo sanitario de la carne y la falta de refrigeración, además de que en estos locales el control de plagas es por lo general muy limitado o inexistente. Sin embargo, esto por sí solo no explica el predominio de S. Lomita, una cepa que no había sido reportada anteriormente en muestras de alimentos en México. Aun

así, aparece como serotipo predominante en carne molida y además exhibe un perfil de multirresistencia a antimicrobianos. Por ello, sería conveniente realizar otros estudios para identificar su origen más probable, así como los factores que condicionan su diseminación en la cadena de abasto, hasta llegar al punto de venta. En materia de susceptibilidad a antibióticos, la elevada tasa de resistencia a β -lactámicos, tetraciclina y trimetoprim-sulfametoxazol, así como el hecho de que casi las tres cuartas partes de los aislamientos resultaron multirresistentes, evidencia que existe una considerable presión de selección de cepas en diferentes segmentos de la cadena productiva.

En este trabajo se observó resistencia a medicamentos empleados exclusivamente en terapéutica humana, tales como el cloranfenicol, cuyo uso en producción animal está prohibido desde hace décadas.³³ Este hallazgo coincide con lo observado en un estudio que se realizó en 2009 en el estado de Hidalgo,¹⁰ en el que el porcentaje de cepas resistentes a cloranfenicol fue ligeramente superior (23.1) al reportado en este trabajo. Ello reafirma la importancia de evaluar los riesgos relacionados con el empleo de antibióticos en medicina humana y medicina veterinaria.

Por otra parte, se observó que casi el 60% de las cepas de *Salmonella* mostraron resistencia a sulfa-trimetoprim, autorizado para tratar infecciones tanto en humanos como en animales. Cabe mencionar que el porcentaje de resistencia aquí encontrado es tres veces superior al reportado hace 6 años.¹⁰ Adicionalmente, un número considerable de aislamientos resistieron antibióticos de amplio espectro, tales como la gentamicina, usada en medicina veterinaria y humana en el tratamiento de múltiples infecciones, tales como septicemias, meningitis, peste y neumonías, entre otras. Asimismo, la resistencia a pefloxacina, si bien se presentó sólo en una cepa, es de las más preocupantes, pues se trata del antibiótico de elección para tratar casos de salmonelosis entérica en adultos.³⁴

Aunque los resultados de este trabajo no permiten vincular las cepas aisladas de la carne con casos clínicos en humanos, la alta proporción de aislamientos que resistieron entre 6 y 8 antibióticos sugiere que la exposición del consumidor mexicano a cepas de *Salmonella* multirresistentes constituye un riesgo latente. Por

ejemplo, serotipos como Javiana suelen presentar una combinación de alta virulencia (la infección provoca complicaciones como meningitis, abscesos hepáticos y colecistitis)³⁵ y un perfil de multirresistencia^{26,29} semejante al reportado para este serotipo en este trabajo (Am/Cb/Cf/Chl/Tet). El tratamiento de infecciones causadas por cepas con estas características puede ser muy complicado. De ahí la importancia de identificar medidas que contribuyan a prevenir la presencia del patógeno en la carne que se expende en los puntos de venta.

Si bien los resultados de este estudio no son necesariamente representativos de la situación nacional, el muestreo en la principal urbe del país constituye una buena aproximación a lo que puede estar sucediendo en el resto de la república. Además, contribuyen a fundamentar la necesidad de migrar hacia un sistema activo de vigilancia epidemiológica, como el que se aplica en países desarrollados.²⁹ Esto es, que se identifique y se tipifique, de manera sistemática, a los patógenos causantes de brotes/casos, así como al alimento involucrado en los mismos. De esta forma, se puede realizar una mejor gestión de los riesgos asociados con el consumo de alimentos.

La presencia de serotipos de *Salmonella*, multirresistentes a antibióticos, en carne de res molida de venta al público en México, evidencia la necesidad de investigar la epidemiología de la contaminación por *Salmonella* durante toda la cadena productiva de carne bovina. Estudios futuros sobre diversidad genética, presencia y mecanismos de transmisión de genes de resistencia y de virulencia, e incluso de secuenciación completa del genoma de las cepas circulantes podrían ofrecer información vital para mejorar la gestión de este riesgo microbiológico.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada con financiamiento del proyecto SAGARPA-CONACYT 109127. Los autores agradecen la colaboración del personal del laboratorio de microbiología general de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Declaración de conflicto de intereses: ninguno de los autores tiene conflicto de intereses con respecto a la presente publicación.

REFERENCIAS

1. CDC. National Salmonella Surveillance Annual Report — Appendices, 2010 [documento en internet]. US Department of Health and Human Services, 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/salmonella-annual-report-appendices-2010-508c.pdf>. Consultado: 26 de Febrero de 2013.
2. EFSA. 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal, 8(1):410.
3. SSA. Anuarios de morbilidad [documento en internet]. Secretaría de Salud, México, 2013. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Consultado: 26 de Febrero de 2015.
4. Rhoades, J.R., G. Duffy K. Koutsoumanis. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: a review. Food Microbiol, 26(4):357-376.
5. Sibhat, B., B. Molla Zewde, A. Zerihun, A. Muckle, L. Cole, P. Boerlin, E. Wilkie, A. Perets, K. Mistry W.A. Gebreyes. 2011. Salmonella serovars and antimicrobial resistance profiles in beef cattle, slaughterhouse personnel and slaughterhouse environment in Ethiopia. Zoonoses Public Health, 58(2):102-109.
6. Zaidi, M.B., J.J. Calva, M.T. Estrada-García, V. León, G. Vázquez, G. Figueroa, E. López, J. Contreras, J. Abbott, S. Zhao, P. McDermott L. Tollefson. 2008. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerg Infect Dis, 14(3):429-435.
7. Grimont, P.A.D., Weill, F. Antigenic formulae of the Salmonella serovars [documento en internet]. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, 2007. Disponible en: <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>. Consultado: 25 de Febrero de 2015.

8. EFSA. 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13(1):3991-4152.
9. Zaidi, M.B., P. McDermott, P. Fedorka-Cray, V. Leon, C. Canche, S. Hubert, J. Abbott, M. Leon, S. Zhao, M. Headrick L. Tollefson. 2006. Nontyphoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis*, 42:21-28.
10. Miranda, J.M., A.C. Mondragón, B. Martínez, M. Guarddon J.A. Rodríguez. 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of Salmonella from Different Raw Foods in Mexico. *J Food Prot*, 72(5):966-971.
11. Perez-Montaña, J.A., D. González-Aguilar, J. Barba, C. Pacheco-Gallardo, C.A. Campos-Bravo, S. García, N.L. Heredia E. Cabrera-Díaz. 2012. Frequency and Antimicrobial Resistance of Salmonella Serotypes on Beef Carcasses at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot*, 75(5):867-873.
12. Varela-Guerrero, J.A., M. Talavera-Rojas, C. Gutierrez-Castillo Adel, N.E. Reyes-Rodriguez J. Vazquez-Guadarrama. 2013. Phenotypic-genotypic resistance in Salmonella spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 45(4):995-1000.
13. Hernández-San Juan, S., A. Zúñiga-Estrada, I. Sánchez-Ortega, J. Castro-Rosas, A.D. Román-Gutiérrez E.M. Santos-López. 2007. Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal del estado de Hidalgo, México. *Vet Mex*, 38(2):187-194.
14. Ryan, T.P., Sample size determination and power. *Wiley Series in Probability and Statistics*. 2013, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 374.
15. INIFAP. Calidad en puntos de venta de carne [documento en internet]. INIFAP, 2012. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIFAP/Calidad%20en%20puntos%20de%20venta%20de%20carne.pdf>. Consultado: 13 de Marzo de 2015.
16. SSA, NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. 1994: Diario Oficial de la Federación. 15 agosto 1994.

17. SSA, Método para la determinación de Salmonella en alimentos. 1994: Diario Oficial de la Federación, 15 de agosto de 1994.
18. Rahn, K., S.A. De Grandis, R.C. Clarke, R. Curtiss C.L. Gyles. 1992. Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Mol Cell Probes*, 6:271-279.
19. Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45(4):493-496.
20. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. 2012: Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
21. Cabrera-Diaz, E., C.M. Barbosa-Cardenas, J.A. Perez-Montano, D. Gonzalez-Aguilar, C. Pacheco-Gallardo J. Barba. 2013. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of salmonella in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. *J Food Prot*, 76(12):2004-10.
22. Gragg, S.E., G.H. Loneragan, K.K. Nightingale, D.M. Brichta-Harhay, H. Ruiz, J.R. Elder, L.G. Garcia, M.F. Miller, A. Echeverry, R.G. Ramirez Porras M.M. Brashears. 2013. Substantial within-animal diversity of Salmonella isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at slaughter. *Appl Environ Microbiol*, 79(15):4744-50.
23. Koohmaraie, M., J.A. Scanga, M.J. De La Zerda, B. Koohmaraie, L. Tapay, V. Beskhlebnyaya, T. Mai, K. Greeson M. Samadpour. 2012. Tracking the sources of Salmonella in ground beef produced from nonfed cattle. *J Food Prot*, 75:1464–1468.
24. Haneklaus, A.N., K.B. Harris, D.B. Griffin, T.S. Edrington, L.M. Lucia J.W. Savell. 2012. Salmonella prevalence in bovine lymph nodes differs among feedyards. *J Food Prot*, 75:1131–1133.
25. SSA, Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009, prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. 2009: Diario Oficial de la Federación, 8 diciembre 2009.

26. Gutiérrez-Cogco, L., E. Montiel-Vázquez, P. Aguilera-Pérez M.C. González-Andrade. 2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Publica Mex*, 42(6):490-495.
27. Osman, K.M.S.H. Marouf. 2014. Comparative dendrogram analysis of OMPs of Salmonella enterica serotype Enteritidis with Typhimurium, Braendurup and Lomita isolated from pigeons. *Int J Adv Biotechnol Res*, 2(1):952-960.
28. Osman, K.M., S.H. Marouf, O.A. Mehana N. AlAtfeehy. 2014. Salmonella enterica serotypes isolated from squabs reveal multidrug resistance and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 33(3):1-19.
29. CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report) [documento en internet]. U.S. Department of Health and Human Services, 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodnet/data/reports.html>. Consultado: 25 de Febrero de 2015.
30. Narvaez-Bravo, C., M.F. Miller, T. Jackson, S. Jackson, A. Rodas-Gonzalez, K. Pond, A. Echeverry M.M. Brashears. 2013. Salmonella and Escherichia coli O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot and Harvest Plant in Mexico. *J Food Prot*, 76(5):786-795.
31. Uyttendaele, M.R., J.M. Debevere, R.M. Lips K.D. Neyts. 1998. Prevalence of Salmonella in poultry carcass and their products in Belgium. *Int J Food Microbiol*, 40:1-8.
32. Kim, S. 2010. Salmonella serovars from foodborne and waterborne diseases in Korea, 1998-2007: total isolates decreasing versus rare serovars emerging. *J Korean Med Sci*, 25(12):1693-9.
33. SARH, NORMA Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos, S.d.A.y.R. Hidráulicos, Editor. 1994: Diario Oficial de la Federación, 27 junio 1994.
34. INFOSAN. Nota de información INFOSAN 3/2005. Resistencia antimicrobiana a Salmonella [documento en internet]. 2005. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_sp.pdf. Consultado: 19 de Diciembre de 2014.

35. Mezal, E.H., R. Stefanova A.A. Khan. 2013. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. *Int J Food Microbiol*, 164(1):113-8.

CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Frecuencia relativa de *Salmonella* spp. y serotipos identificados en muestras de carne de res molida de la Ciudad de México, **abril a noviembre de 2013**

Origen de la muestra	n	Frecuencia relativa de <i>Salmonella</i> spp.	Serotipos	No. aislamientos
Supermercados	50	6.0	Cannstatt	1
			N.D. ¹	2
Tianguis	5	40.0	Lomita	1
			Senftenberg	1
Carnicerías	15	26.7	Derby	2
			Lomita	2
Mercados públicos	30	33.3	Derby	2
			Javiana	1
			Lomita	3
			N.D. ¹	3
			Senftenberg	1

¹Serotipo no determinado en aislamientos con resultados no concluyentes.

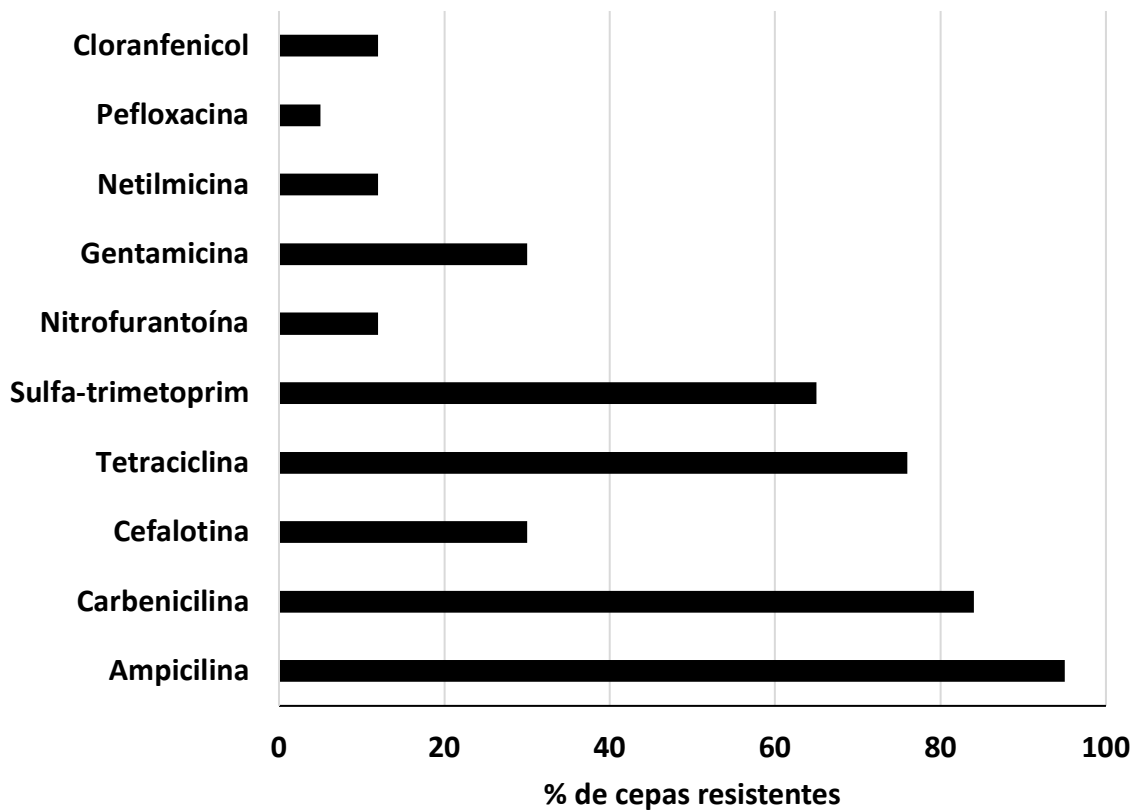
Cuadro II. Perfil de resistencia a antibióticos de los serotipos de *Salmonella* spp. aislados de carne molida de res en la Ciudad de México, **abril a noviembre de 2013**

Origen	Serotipo	Perfil de resistencia ¹	Resistencia intermedia
Mercados	Derby	Am/Cb/Sxt/Tet	
	Javiana	Am/Cb/Cf/Chl/Tet	Cro/Ge
	N. D. ²	Am/Cb/Cf/Sxt/Ge/Nf/Net/Tet	
	N. D. ²	Am/Cb/Sxt/Ge/Tet	Nf
	N. D. ²	Cb/Nf	Cf/Ge
	Lomita	Am/Cb/Sxt/Tet	
Carnicerías	Lomita	Am/Cb/Sxt/Tet	
	Lomita	Am/Cb/Sxt/Tet	
	Derby	Am	Cb
	Derby	Am/Cb	
Tianguis	Senftenberg	Am/Cb/Sxt/Chl/Tet	
	Lomita	Am/Cb/Cf/Sxt/Tet	
Mercados	Senftenberg	Am/Cb/Cf/Sxt/Chl/Ge/Tet	Ak
	Lomita	Am/Cb/Sxt/Pef/Tet	Cf
	Lomita	Am/Cf/Sxt/Ge/Tet	Cb
	Derby	Am/Cf	Cb
Supermercados	Cannstatt	Am/Cb/Tet	
	N. D. ²	Am/Cb/Sxt/Ge/Net/Nf	
	N. D. ²	Am/Cb/Sxt/Ge	

¹Am: Ampicilina; Cb: Carbenicilina; Tet: Tetraciclina; Sxt: Sulfa-trimetoprim; Cf: Cefalotina; Nf: Nitrofurantoína; Ge: Gentamicina; Pef: Pefloxacina; Chl: Cloranfenicol; Net: Netilmicina; Cro: Ceftriaxona; Ak: Amikacina

²ND: No determinado

Figura 1. Porcentaje de cepas de *Salmonella* spp. (n=19) resistentes a cada uno de los antibióticos probados en el estudio



Artículo relacionado No. 2. De la Garza García et al. 2019 (In Press)

Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* asociadas con el proceso de matanza y deshuese de bovinos

Phenotypic and molecular characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. associated with beef cattle slaughter and fabrication process

Resumen

El objetivo fue caracterizar cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. asociadas con el proceso de matanza y deshuese de bovinos. Se tomaron muestras de heces, canales y cortes primarios (100 de cada tipo) en un rastro ubicado en el norte de México. *E. coli* no se analizó en heces, por ser esta bacteria parte de la microbiota intestinal. La identificación de las cepas se realizó bioquímicamente y por PCR: gen *invA*, para *Salmonella* spp. y *gadA*, para *E. coli*. Para esta última se determinó también la presencia de genes asociados con los patotipos STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*), ETEC (*estA*, *eltA*) y EPEC (*eae*, *bfp*). La frecuencia de *E. coli* en canales fue de 34% y en cortes 11%, con una concentración promedio de 0.12 y 0.33 log UFC/cm², respectivamente. Casi todos los serotipos de *E. coli* que se identificaron han sido asociados con los patotipos STEC o ETEC. Sin embargo, ninguna de las cepas portaba los factores de virulencia investigados. *Salmonella* spp. se presentó en 35% en heces, 4% en canales y 2% en cortes, siendo Montevideo el serotipo predominante (72.5% del total de cepas). En resumen, las canales y los cortes de bovinos no parecen ser una fuente relevante de cepas patógenas de *E. coli*. No obstante, los bovinos constituyen un importante reservorio de *Salmonella* spp., lo que representa un riesgo para la salud pública. Se requieren estudios genómicos sobre el perfil de virulencia y los genes asociados con infecciones subclínicas en cepas provenientes de animales aparentemente sanos.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Bovinos, Sacrificio, Serotipos, Patotipos.

1 **Abstract**

2 The objective was to characterize strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated along
3 the beef slaughter and fabrication process. For that purpose, we took 100 samples of rectal
4 contents, hot carcasses and primal cuts (300 in total) in a Federally Inspected slaughterhouse.
5 *E. coli* was not analyzed in feces since this bacterium is part of the intestinal microbiota. Isolates
6 were confirmed both biochemically and through PCR (targeting *gadA* and *invA* genes, for *E.*
7 *coli* and *Salmonella* spp., respectively). We conducted additional PCR tests for *E. coli*, targeting
8 genes associated with pathotypes STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*), ETEC (*estA*, *eltA*), and EPEC (*eae*,
9 *bfp*). *E. coli* was found at a frequency of 34% in carcasses and 11% in primal cuts, and at an
10 average concentration of 0.12 and 0.33 log CFU/cm², respectively. However, none of these
11 isolates belonged to any of the investigated pathotypes. *Salmonella* spp. was found in 35% of
12 feces, 4% of carcasses and 2% of primal cuts, with Montevideo being the predominant serovar
13 (72.5% of all isolates). In summary, beef carcasses and cuts do not seem to be a significant
14 source of pathogenic *E. coli*. Conversely, bovines are a significant reservoir of *Salmonella* spp.,
15 representing a latent risk for public health. Further studies are needed to identify factors
16 associated with the predominance of certain *Salmonella* spp. serovars in animal production
17 settings, as well as with their ability to establish subclinical infections.

18 **Key words:** *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Beef cattle, Slaughter, Serovars,
19 **Pathotypes.**

20 **Introducción**

21 Las infecciones intestinales causadas por *Salmonella* spp. y los distintos patotipos de *E. coli*,
22 como los productores de toxinas tipo shiga (STEC), constituyen un problema de salud pública
23 a escala global⁽¹⁾. Ambos patógenos suelen contaminar la carne de diferentes especies, entre
24 ellas la de bovino^(2,3), que es el segundo tipo de carne que más se consume en México⁽⁴⁾. Por
25 ello, la caracterización de las cepas de *Salmonella* spp. y *E. coli* que circulan en la cadena
26 productiva de bovinos de carne es de vital importancia para mejorar la gestión de los riesgos
27 asociados con ambos patógenos.

28 La mayoría de los estudios realizados en este campo en México se concentran en un solo
29 punto de la cadena productiva. Por ejemplo, varios autores han observado frecuencias
30 moderadas (8-15%) de *Salmonella* spp. en canales de bovino⁽⁵⁻⁷⁾, sin que se reporte en todos
31 los casos los serotipos representados. En estudios más completos se reportan niveles de
32 contaminación más elevados (25-100%) en piel, heces, linfonodos, canales no refrigeradas y
33 carne⁽⁸⁻¹⁰⁾, detectándose sobrerrepresentación de ciertos serotipos en algunas de las matrices
34 analizadas. Sin embargo, la comparación entre estudios es difícil, debido a la variación que
35 existe en cuanto al tipo de muestra analizada, segmento de la cadena productiva, metodología
36 de análisis empleada, así como zona geográfica y/o sistema de producción animal y/o
37 condiciones sanitarias del proceso bajo estudio.

38 En el caso de *E. coli*, la situación es similar. La mayoría de los estudios se enfoca en un
39 segmento de la cadena productiva y en cepas STEC entero-hemorrágicas, tales como *E. coli*
40 O157:H7^(6,11,12). Aunque en estudios previos se ha reportado una baja frecuencia (1-3%) de
41 cepas patógenas de *E. coli* en canales y en heces de bovinos⁽¹¹⁻¹³⁾, no se ha explorado a fondo
42 la distribución de estas a lo largo de la cadena productiva. Esta información puede contribuir a
43 identificar patrones de diseminación en diferentes procesos y/o en distintas zonas geográficas,
44 así como medidas que contribuyan a garantizar la inocuidad de los alimentos y a proteger la
45 salud pública. Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo realizar la caracterización
46 fenotípica y molecular de cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. obtenidas en diferentes etapas
47 del proceso de matanza y corte de bovinos en un rastro Tipo Inspección Federal.

48

49 **Materiales y métodos**

50 **Diseño del estudio y determinación del tamaño de muestra**

51 Se realizó un muestreo en tres de las etapas del proceso de transformación del bovino desde
52 la matanza hasta el corte: 1) contenido rectal obtenido después de la evisceración, 2) canales
53 calientes y 3) cortes primarios. Cada etapa se consideró como un muestreo por separado
54 puesto que no era posible determinar con anticipación el destino de los animales, ya que
55 algunos se vendieron en canales enteras y otros en cortes. El tamaño de muestra para cada
56 etapa a evaluar fue calculado mediante la fórmula estadística para determinar el tamaño de
57 muestra para una proporción de una población, cuando no conocemos el número de elementos
58 en esa población⁽¹⁴⁾:

59
$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2} \quad ; \text{ donde:}$$

60 n = tamaño de muestra

61 Z_{α}^2 = Valor de Z en una distribución normal $Z_{\alpha} = 1.96$ cuando $\alpha = 0.05$

62 p = proporción de la población que presenta la característica estudiada (si se
63 desconoce se emplea 0.5, como en este caso)

64 q = proporción aproximada de la población que no presenta la característica
65 estudiada(1-p)

66 d = error o precisión deseada, que se fijó en 10% (0.1)

67 Con dicha formula se obtuvo un tamaño de muestra por etapa de 96, el cual se redondeó a
68 100, para un total de 300 muestras en el estudio. El estudio se realizó en una empresa
69 integrada de producción de carne de bovino situada en el norte México, y que incluye corrales
70 de engorda, rastro y sala de corte. Los animales, finalizados durante un promedio 190 días en
71 la engorda, provienen de ocho estados de la República Mexicana. La empresa fue
72 seleccionada por sus características integrales, que permiten tener un modelo de la cadena
73 productiva en un solo sitio.

74 **Toma de muestras**

75 *Contenido rectal*

76 Las muestras de heces se tomaron del recto, después de la evisceración, aproximadamente a
77 los 20 min después de la muerte del animal. Para ello, se retuvieron momentáneamente los
78 paquetes de vísceras en la rampa de eviscerado, se abrió la ligadura del recto y se usaron
79 guantes nuevos de nitrilo para recolectar las muestras de heces, mismas que fueron
80 depositadas en bolsas estériles para su posterior procesamiento. Cada muestra se tomó con
81 un nuevo par de guantes. Debido a que *E. coli* forma parte de la microbiota intestinal del bovino,
82 se asumió que todas las muestras resultarían positivas y con altas concentraciones, por lo que
83 no se hizo el muestreo de rectos para *E. coli*.

84

85 *Canales sin refrigerar*

86 Se empleó la metodología utilizada por la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos en
87 sus estudios microbiológicos de línea base para la especie bovina⁽¹⁵⁾ con ligeras
88 modificaciones. En lugar de canales refrigeradas, se muestrearon canales calientes y se
89 empleó el agua peptonada de una misma canal para la detección de ambos patógenos (*E. coli*
90 y *Salmonella* spp.). En todos los casos, se muestrearon medias canales (lado derecho)
91 empleando esponjas y marcos estériles desechables de 10 x 10 cm² (Meat/Turkey Carcass
92 Sampling Kit, NASCO®) en tres puntos de la canal (pierna, falda y pecho) para dar un total de
93 superficie de 300 cm² por canal.

94 *Cortes*

95 En la sala de cortes, una vez que se obtuvieron los cortes primarios y antes del empaçado, se
96 seleccionaron al azar piernas, faldas y pechos para la toma de muestras. Para ello, se utilizó
97 el mismo método descrito anteriormente para las canales, excepto porque se tomó un solo
98 marco de 100 cm² por corte.

99

100 **Análisis microbiológicos**

101 Una vez tomadas las muestras, las esponjas fueron selladas en bolsas estériles de plástico y
102 guardadas en hieleras con geles refrigerantes para su traslado al laboratorio de la planta. De
103 los 10 mL de agua peptonada se inocularon por triplicado 100 µL en placas con agar
104 *Salmonella-Shigella* (SS) (MCD Lab®, PRONADISA-CONDA®, España), las cuales se

105 incubaron a 37 °C y se revisaron a las 24, 48 y 72 h. Las placas que no mostraron crecimiento
106 de colonias con morfología típica de *Salmonella* spp. a las 72 h se consideraron como
107 negativas. Para las muestras de heces, se emplearon hisopos estériles para realizar la siembra
108 directa en medio SS y se procedió de igual forma para la incubación y lectura de las placas.
109 Las cajas que contenían colonias con morfología sugerente de *Salmonella* spp. (con
110 producción de ácido sulfhídrico, colonias redondeadas, convexas de borde regular) fueron
111 sembradas en medio CHROMAgar Salmonella Plus (CHROMAgar®, París, Francia) para su
112 purificación y confirmación. Todas las colonias sugerentes a *Salmonella* spp. (productoras de
113 ácido sulfhídrico o de coloración morada en CHROMAgar Salmonella Plus) fueron
114 recuperadas. Los aislamientos puros y confirmados con el medio selectivo y diferencial fueron
115 sembrados en agar tripticaseína de soya (TSA) para su caracterización por métodos
116 bioquímicos y por PCR.

117 Del volumen restante del agua peptonada, se tomó 1 mL para cada placa rehidratable 3M
118 Petrifilm® *E. coli*/Coliformes (3M, Saint Paul, Estados Unidos de América), para estimar la
119 concentración de *Escherichia coli* genérica y de coliformes totales. Las placas 3M Petrifilm
120 fueron incubadas a 37°C y analizadas a las 24 y 48 h, de acuerdo con las instrucciones del
121 fabricante. Se empleó el medio CHROMAgar ECC (CHROMAgar®, París, Francia) para aislar
122 las cepas identificadas en las placas 3M Petrifilm.

123

124 **Caracterización bioquímica**

125 Las cepas de *Salmonella* fueron identificadas con substratos preparados en el laboratorio que
126 incluyeron fermentación de glucosa y lactosa, con producción de gas y capacidad de producir
127 H₂S, agar Kligler, rojo de metilo y Voges-Proskauer, producción de ureasa e indol, utilización de
128 citrato y de malonato como única fuente de carbono, desaminación de fenilalanina, oxidación
129 del ácido glucónico y descarboxilación de lisina, arginina y ornitina⁽¹⁶⁾.

130

131 **Caracterización molecular**

132 La caracterización molecular se realizó mediante PCR de punto final, empleando iniciadores
133 contra secuencias específicas de genes típicos de cada especie (Cuadro 1). Para *Salmonella*
134 spp. se utilizó el gen *invA*⁽¹⁷⁾ y para *E. coli*, el gen *gadA*⁽¹⁸⁾, el cual codifica para la subunidad
135 alfa de la glutamato descarboxilasa, perteneciente al sistema de resistencia al estrés ácido en

136 *E. coli*. Además, para identificar los patotipos presentes, se incluyeron otros seis genes
137 asociados con cepas enteropatógenicas (EPEC), enterotoxigénicas (ETEC) y productoras de
138 toxina tipo shiga (STEC). Por ejemplo, el gen *eaeA*, codifica para una intimina, proteína
139 importante para la adhesión mediante el receptor translocado de intimina⁽¹⁹⁾ y se encuentra
140 presente en el genoma de los patotipos EPEC y STEC. Por su parte, los genes que codifican
141 para las toxinas tipo shiga 1 (*stx1*) y 2 (*stx2*) suelen presentarse en las cepas STEC, las cuales
142 manifiestan el mismo fenotipo ya sea que porten uno de estos genes o ambos⁽¹⁹⁾. También se
143 investigó la presencia de genes codificantes para las toxinas termoestable (*estA*) y termolábil
144 (*eltA*), asociados con cepas ETEC⁽²⁰⁾; así como el gen *bfp* (del inglés *bundle forming pilus*),
145 que codifica para los pili formadores de penachos, involucrados en la adhesión al epitelio
146 intestinal y que típicamente se encuentra en el genoma de cepas EPEC⁽²⁾. Las reacciones de
147 PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL y se utilizaron los reactivos del Top Taq Master
148 Mix Kit de la marca QIAGEN®, con las siguientes concentraciones finales: 1.25 Unidades de
149 Taq Polimerasa, 1.5 mM MgCl₂, 1x Buffer para PCR, 200µM de cada dNTP. Las condiciones
150 empleadas para cada reacción fueron las mismas descritas en publicaciones anteriores (ver
151 Cuadro 1).

152 Los productos de amplificación por PCR fueron procesados por electroforesis en agarosa
153 (SeaKem® LE Agarose, Lonza, ME, EEUU) al 1% para los productos de alto peso molecular
154 (*gadA*, *eaeA*, *stx1*) y al 2% para los más pequeños (*eltA* y *estA*). Los geles fueron corridos a
155 voltaje constante de 80 V por 50 min y la visualización y digitalización de imágenes se realizó
156 en un fotodocumentador Gel Logic 2200 con el software Care Stream®.

157

158 **Serotipificación**

159 *Salmonella* spp.

160 **Tipificación serológica del antígeno somático (O).** La identificación serológica de las cepas
161 de *Salmonella* se realizó de acuerdo al esquema de Kauffmann–White^(21,22). La obtención del
162 antígeno somático (O) se llevó a cabo hirviendo los cultivos bacterianos a vapor fluente durante
163 1 h. El antígeno O se determinó utilizando sueros polivalentes anti-O A, B, D, D, E, F y G de
164 (DIFCO, BD) y sueros anti-O monovalentes (específicos) de los serogrupos A, C, D, E y F
165 (DIFCO, BD).

166 **Tipificación serológica del antígeno flagelar (H).** Este antígeno se obtuvo inoculando las
167 cepas en medio semisólido en tubos de Cragie´s y resemebrando en caldo nutritivo. El antígeno
168 H de fase I y II de las cepas se determinó utilizando el sistema de antisueros-H Spicer-Edwards
169 (DIFCO) y sueros monovalentes (específicos) de los serogrupos A, B, C, D, E y F.

170

171 *E. coli*

172 Las cepas de *E. coli* fueron serotipificadas utilizando microaglutinación en placa de 96 pozos
173 y 187 sueros anti-antígeno somático (O) y 53 sueros anti-antígeno flagelar (H) obtenidos en
174 conejo (SERUNAM), empleando el método descrito por Ørskov y Ørskov⁽²³⁾, con
175 modificaciones menores.

176

177 *Clasificación por filogrupos*

178 Debido a que ciertos filogrupos de *E. coli* están asociados con animales o con humanos, así
179 como con diferentes patotipos de la bacteria, se decidió realizar la clasificación en grupos
180 filogenéticos mediante PCR, según el esquema de Clermont⁽²⁴⁾. Esta técnica permite dividir a
181 los aislamientos de *E. coli* en siete grupos filogenéticos característicos de la especie (A, B1,
182 B2, C, D, E y F) y un grupo adicional, correspondiente al Clado Críptico I. La prueba se realizó
183 mediante una reacción de PCR cuádruple inicial, que detecta los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y
184 *TSPE4.C2*. Además, en caso de obtener resultados sugerentes de filogrupos E y C, se realiza
185 un PCR dúplex adicional dirigido hacia una variante alélica del gen *arpA* (específica del grupo
186 E); o bien, a una variante alélica del gen *trpA* (específica para el grupo C), más un control
187 interno dirigido para el gen *trpBA*. Las reacciones se llevaron a cabo directamente, a partir de
188 colonias frescas crecidas 24 horas en agar TSA. Las reacciones de PCR se realizaron a un
189 volumen de 25 µL, bajo las mismas condiciones descritas previamente⁽²⁶⁾. Los productos de
190 amplificación por PCR fueron procesados por electroforesis en agarosa (SeaKem® LE
191 Agarose, Lonza, ME, EEUU) al 2%, corriendo a voltaje constante a 80 V por 50 min. La
192 visualización y digitalización de imágenes se realizó en un fotodocumentador Gel Logic 2200,
193 con el programa Care Stream®.

194

195

196

197 **Análisis de la información**

198 Se calculó la frecuencia de positividad para ambos patógenos en las muestras evaluadas, así
199 como la concentración en el caso de *E. coli*. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado y la razón de
200 momios para detectar asociación entre la positividad a los patógenos y el tipo de muestra.

201

202 **Resultados**

203 Del total de muestras analizadas (300 para *Salmonella* spp. y 200 para *E. coli*) se obtuvieron
204 86 aislamientos, 41 de ellos fueron identificados como *Salmonella* spp. y otros 45 como *E. coli*,
205 para una frecuencia global de 13.7 y 22.5%, respectivamente. Sólo una de las muestras,
206 proveniente de una canal, fue positiva para ambas bacterias.

207

208 ***Salmonella* spp.**

209 La frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. fue de 35% en heces, mientras
210 que en canales y en cortes fue de 4 y 2%, respectivamente (Figura 1). De los 41 aislamientos
211 obtenidos, 39 fueron identificados como *Salmonella* spp. mediante pruebas bioquímicas. Lo
212 anterior debido a resultados atípicos en el metabolismo de amino ácidos y en la producción de
213 ácido sulfhídrico. Sin embargo, los 41 aislamientos fueron confirmados por PCR, debido a que
214 amplificaron el fragmento del gen *invA*.

215 La prueba de Chi cuadrado evidenció que existe una fuerte asociación ($\chi^2=27.1$, $P<0.00001$)
216 entre el tipo de muestra y la frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. Esto fue
217 confirmado por la razón de momios, donde la probabilidad de encontrar muestras positivas a
218 *Salmonella* spp. en heces fue mucho mayor que en las demás matrices (razón de
219 probabilidades 18.2, intervalo de confianza al 95% 7.3-45.2, $P<0.0001$).

220 Con respecto a los serotipos presentes, se logró tipificar 35 de los 41 aislamientos. Las otras
221 seis cepas sólo pudieron ser caracterizadas parcialmente, pues presentaron un antígeno O
222 rugoso, por lo que sólo fue posible obtener una fórmula antigénica parcial, basada en el
223 antígeno flagelar. En total, se identificaron 3 serovariedades: Reading (n=2), Newport (n=4) y
224 Montevideo (n=29). Todos los aislamientos correspondientes al serotipo Montevideo fueron
225 monofásicos para el antígeno H, aunque las fórmulas antigénicas permitieron identificar dos
226 subgrupos dentro de este serotipo, 22 de ellos provenientes de heces, canales y cortes, con la

227 fórmula 6,7:g,m,s:-. Las 7 cepas restantes, todas provenientes de heces, presentaron la
228 fórmula 6,7:g,m,p,s:-.

229 La distribución de serotipos por clase de muestra evidenció que *Salmonella enterica* subsp.
230 *enterica* ser. Montevideo estuvo representada en todas las matrices analizadas, al igual que
231 las cepas no tipificables. Por el contrario, las cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser.
232 Newport y Reading, que se encontraron con mucho menor frecuencia que *Salmonella*
233 Montevideo, sólo se detectaron en las heces (Figura 2).

234

235 ***E. coli***

236 *E. coli* se encontró en 34% de las canales y en 11% de los cortes. En estos últimos, las
237 muestras positivas se distribuyeron de forma relativamente homogénea, obteniéndose 5 cepas
238 del pecho, 3 de la falda y 3 de la pierna. La concentración que se determinó en esta bacteria
239 fue baja, tanto en canales como en cortes, con valores que fluctuaron entre 1 y 8 UFC/cm².

240 De los 45 aislamientos obtenidos, identificados mediante placas 3M petrifilm y CHROMAgar
241 ECC, 41 mostraron un fenotipo característico de la especie. Las cuatro cepas restantes, todas
242 provenientes de canales, presentaron resultados atípicos; tres de ellas indol negativas y con
243 lenta fermentación de lactosa y una más que resultó positiva a citrato, malonato y celobiosa.
244 No obstante, todas las cepas fueron confirmadas molecularmente por PCR, empleando el gen
245 *gadA* como marcador.

246 Se identificaron total o parcialmente 31 serotipos de *E. coli* (Cuadro 2). Los serogrupos más
247 frecuentes fueron O8 (29%) y O71 (19.4%); mientras que el serotipo más comúnmente
248 encontrado fue el O1:H6 (9.7%).

249 Los grupos filogenéticos predominantes fueron A (60%) y B1 (26.7%), el grupo B2 estuvo
250 ausente; mientras que los grupos C y D se presentaron en frecuencias bajas (2.2 y 6.7%).
251 Hubo dos cepas con resultados no concluyentes, por lo cual no se les pudo asignar a ningún
252 filogrupo. Resultó interesante observar que algunos serogrupos estuvieron fuertemente
253 asociados con ciertos grupos filogenéticos. En el serogrupo O8, 8 de 9 cepas pertenecen al
254 filogrupo B1. De igual forma, 4 de 5 cepas del serogrupo O71 pertenecen al filogrupo A y todas
255 las cepas del serogrupo O1 pertenecen al filogrupo D (Figura 3).

256 **Discusión**

257 En varios países desarrollados, con sistemas de explotación intensiva de ganado bovino
258 similares a los que existen en México, los niveles de contaminación con *Salmonella* spp. suelen
259 ser bajos, tanto en canales y carne como en muestras de heces⁽²⁵⁻²⁷⁾. Sin embargo, en este
260 trabajo se observó una frecuencia moderadamente alta de contaminación en heces, la cual
261 coincide con la reportada en otros rastros TIF del país⁽⁹⁾. Esto indica que en México las granjas
262 de bovinos de engorda pueden constituir un importante reservorio de este patógeno. Sin duda,
263 esto representa un desafío considerable para las intervenciones aplicadas durante la matanza,
264 que aunque reducen drásticamente la contaminación de las canales en relación con las
265 excretas, evidentemente no alcanzan a controlar por completo el patógeno. Asimismo,
266 *Salmonella* también fue detectada en cortes primarios, lo que evidencia que este organismo
267 tiene el potencial para diseminarse a lo largo de la cadena productiva. Esto se demuestra al
268 detectar cepas de un mismo serotipo en heces, canales y cortes que. Además, nuestros
269 resultados son similares a los de estudios previos en los que se reporta la presencia de
270 *Salmonella* (2-30%) en muestras de carne en supermercados^(28,29), los cuales sólo expenden
271 carne proveniente de rastros TIF. Esta situación implica un panorama epidemiológico más
272 preocupante en las cadenas de comercialización asociadas con rastros municipales, los cuales
273 carecen de la infraestructura y de las condiciones sanitarias que existen en rastros TIF⁽³⁰⁾. De
274 hecho, la frecuencia con que se detecta *Salmonella* en puntos de venta que comercializan
275 carne de rastros municipales por lo general supera el 50%^(10,31).

276 Lo analizado hasta el momento evidencia la necesidad de reforzar las medidas de control de
277 *Salmonella* spp. en animales vivos, debido a que, por lo general, las intervenciones que se
278 aplican en granja son muy limitadas. En este sentido, la evaluación de la prevalencia de
279 *Salmonella* spp. en los becerros que entran a las granjas de engorda, el monitoreo de animales
280 infectados y su manejo separado, así como la detección de posibles reservorios del patógeno,
281 son sólo algunas de las medidas que podrían favorecer la disminución del porcentaje de
282 animales portadores de *Salmonella* spp. que llegan al rastro.

283 Con respecto a los serotipos que se detectaron, todos han sido relacionados previamente con
284 infecciones humanas en México⁽³²⁾, por lo que el riesgo que representan estas cepas para la
285 salud pública no debe minimizarse. El claro predominio que tuvo *Salmonella* Montevideo en
286 los procesos estudiados es notorio, además de sorpresivo, tomando en cuenta que la empresa

287 que participó en el estudio engorda animales que provienen de ocho diferentes estados del
288 país. También resulta interesante la ausencia de serotipos que en el pasado eran muy
289 comunes en muestras asociadas con ganado bovino en México, tales como Typhimurium,
290 Anatum y Agona, entre otros⁽³³⁾. Aunque se ha reportado que la distribución de serotipos de
291 *Salmonella* spp. suele variar con el tiempo, así como entre zonas geográficas y estudios, la
292 sobrerrepresentación de *Salmonella* Montevideo en la muestra estudiada es consistente con
293 la creciente prevalencia de este serotipo en América del Norte^(34,35). Asimismo, en los estudios
294 más recientes realizados en México se reportan serotipos como Montevideo y Reading, pero
295 no Typhimurium, en cepas obtenidas de heces, canales y linfonodos de bovinos^(8,9). En
296 cualquier caso, resulta difícil determinar los factores asociados con el predominio de ciertas
297 cepas en sistemas de producción animal sin recurrir a estudios moleculares que aborden la
298 diversidad genética de las poblaciones, así como la presencia de genes asociados con
299 virulencia, persistencia ambiental e infecciones subclínicas. No obstante, los resultados indican
300 que bovinos aparentemente sanos pueden portar *Salmonella* spp. en frecuencias
301 moderadamente altas y que el patógeno es capaz de diseminarse más allá del proceso de
302 matanza y faenado, con los riesgos que ello implica en términos de inocuidad de alimentos.
303 En relación con *E. coli*, aunque se encontró con una frecuencia similar a la de *Salmonella* en
304 canales y en un porcentaje mucho más elevado en cortes, esta bacteria se presentó en bajas
305 concentraciones (<8 UFC/cm²). Además, al parecer existe en el país una escasa circulación
306 de cepas patógenas en bovinos, a diferencia de otros países, como Estados Unidos de
307 América, en los que estas se consideran un problema de salud pública⁽³⁶⁾. Así lo demostró la
308 ausencia de factores de virulencia asociados con los patotipos STEC, EPEC y ETEC en la
309 muestra estudiada. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas⁽¹³⁾ en las que se
310 detectaron serovariedades (O157 y no O157) asociadas con cepas STEC (n=146), pero sólo
311 dos de estas portaban los factores de virulencia característicos. Esta tendencia se mantiene
312 en estudios más recientes, en los que se reportan tasas muy bajas (<1%) de contaminación
313 con cepas patógenas de *E. coli* en canales y carne molida de bovinos en México^(9,37,38). Tal
314 comportamiento podría obedecer a múltiples factores. Entre estos, el fotoperíodo, que es
315 mucho más largo durante el verano en los países situados más al norte, se ha considerado
316 como responsable del marcado efecto estacional en la prevalencia de *E. coli* patogénica en
317 ganado bovino en estas naciones. Otros autores han sugerido que la circulación de otras

318 enterobacterias con reactividad cruzada de antígenos somáticos (O) en las poblaciones
319 bovinas de México podría resultar en la selección negativa de patotipos de *E. coli*⁽³⁹⁾. Ello
320 coincide con el alto porcentaje de muestras de suero bovino, proveniente de animales
321 aparentemente sanos, que manifestó respuesta bactericida contra *E. coli* O157 (71%) en hatos
322 del centro de México⁽⁴⁰⁾.

323 En cuanto a los filogrupos de *E. coli* que se identificaron, el predominio de los grupos A y B1
324 es consistente con lo que comúnmente se observa en cepas de origen animal^(41,42). En línea
325 con la ausencia de genes de virulencia asociados con patotipos, solamente una cepa fue
326 clasificada en el grupo C, al cual pertenecen otras cepas STEC de origen animal^(41,43). No
327 obstante, cabe destacar que prácticamente todos los serotipos que aquí se identificaron han
328 sido asociados con los patotipos STEC o ETEC, ambos de importancia en enfermedades
329 transmitidas por alimentos⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Aunque no se ha estudiado el riesgo a la salud que podrían
330 representar las cepas de serotipos que no portan genes de virulencia, éste no debe
331 descartarse del todo, puesto que existe la posibilidad de que cepas no patógenas adquieran
332 dichos factores mediante la incorporación de plásmidos y/o fagos^(47,48), un área en la que se
333 requiere de más investigación.

334

335 **Conclusiones e implicaciones**

336

337 En este estudio se comprobó que el bovino es un importante reservorio de serotipos de
338 *Salmonella* spp. También se demuestra que las intervenciones que se aplican durante el
339 procesamiento de la canal, aun en aquellos rastros que poseen condiciones sanitarias de
340 proceso, equivalentes a las de países desarrollados, no son suficientes para prevenir la
341 diseminación de este patógeno hacia los siguientes segmentos de la cadena productiva. Lo
342 anterior implica un riesgo latente para la salud pública, de ahí la importancia de realizar
343 estudios posteriores sobre los factores genéticos que condicionan la colonización del bovino
344 por esta bacteria, así como su persistencia en las poblaciones ganaderas. Por otra parte, los
345 resultados confirman que la circulación de cepas patógenas de *E. coli* en canales y cortes de
346 bovino en México es baja. Aunque esta tendencia coincide con la observada en investigaciones
347 previas, se debe tomar en cuenta que la población estudiada proviene de un solo rastro y que

348 el alcance del presente trabajo no considera muestras de piel o de heces, en las que existe
349 mayor probabilidad de encontrar cepas patógenas.

350

351 **Agradecimientos y conflictos de interés**

352

353 Este estudio fue realizado con recursos del fondo sectorial SAGARPA-CONACYT, proyecto
354 109127. Los autores agradecen el apoyo técnico de los profesionales del Hospital General “Dr.
355 Manuel Gea González”, de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
356 México y de la Universidad Autónoma de Baja California, por su asistencia en la conducción
357 de los experimentos y en los análisis de laboratorio. Los autores declaran que no tienen
358 conflictos de interés con respecto a la presente publicación.

359

360 **Literatura citada:**

361 1. WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden
362 epidemiology reference group 2007-2015. [http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/)
363 [diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/). Consultado Oct 5, 2018.

364 2. Croxen, MA, Law, RJ, Scholz, R, Keeney, KM, Wlodarska, M, Finlay, BB. Recent Advances in
365 Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 2013;26(4):822-880.

366 3. Koohmaraie, M, Scanga, JA, De La Zerda, MJ, Koohmaraie, B, Tapay, L, Beskhlebnaya, V *et al*.
367 Tracking the Sources of Salmonella in Ground Beef Produced from Nonfed Cattle. J Food Protect
368 2012;75(8):1464-1468.

369 4. FAOSTAT. Food Balance Sheets. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Statistics
370 Division. <http://faostat3.fao.org/download/FB/FBS/E>. Consultado Sep 5, 2018.

371 5. Varela-Guerrero, JA, Talavera-Rojas, M, Gutierrez-Castillo Adel, C, Reyes-Rodriguez, NE, Vazquez-
372 Guadarrama, J. Phenotypic-genotypic resistance in Salmonella spp. isolated from cattle carcasses from
373 the north central zone of the State of Mexico. Trop Anim Health Prod 2013;45(4):995-1000.

374 6. Hernández-San Juan, S, Zúñiga-Estrada, A, Sánchez-Ortega, I, Castro-Rosas, J, Román-Gutiérrez,
375 AD, Santos-López, EM. Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal
376 del estado de Hidalgo, México. Vet Mex 2007;38(2):187-194.

- 377 7. Perez-Montaño, JA, González-Aguilar, D, Barba, J, Pacheco-Gallardo, C, Campos-Bravo, CA,
378 García, S *et al.* Frequency and Antimicrobial Resistance of Salmonella Serotypes on Beef Carcasses
379 at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot* 2012;75(5):867-873.
- 380 8. Gragg, SE, Loneragan, GH, Nightingale, KK, Brichta-Harhay, DM, Ruiz, H, Elder, JR *et al.* Substantial
381 within-animal diversity of Salmonella isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at slaughter.
382 *Appl Environ Microbiol* 2013;79(15):4744-4750.
- 383 9. Narvaez-Bravo, C, Miller, MF, Jackson, T, Jackson, S, Rodas-Gonzalez, A, Pond, K *et al.* Salmonella
384 and Escherichia coli O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot
385 and Harvest Plant in Mexico. *J Food Prot* 2013;76(5):786-795.
- 386 10. Zaidi, MB, McDermott, P, Fedorka-Cray, P, Leon, V, Canche, C, Hubert, S *et al.* Nontyphoidal
387 Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children and raw retail meats in Yucatan, Mexico.
388 *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*
389 2006;42(21-28).
- 390 11. Callaway, TR, Anderson, RC, Tellez, G, Rosario, C, Nava, GM, Eslava, C *et al.* Prevalence of
391 Escherichia coli O157 in cattle and swine in central Mexico. *J Food Prot* 2004;67(10):2274-2276.
- 392 12. Amezcuita-Lopez, BA, Quinones, B, Cooley, MB, Leon-Felix, J, Castro-del Campo, N, Mandrell, RE
393 *et al.* Genotypic analyses of shiga toxin-producing Escherichia coli O157 and non-O157 recovered from
394 feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLoS one* 2012;7(12):e51565.
- 395 13. Varela-Hernandez, JJ, Cabrera-Diaz, E, Cardona-Lopez, MA, Ibarra-Velazquez, LM, Rangel-
396 Villalobos, H, Castillo, A *et al.* Isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli
397 O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int J Food Microbiol*
398 2007;113(2):237-241.
- 399 14. Jekel, JF, Katz, DL, Elmore, JG. *Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine*. 2007, Third
400 Edition, Philadelphia, PA, United States of America: SAUNDERS ELSEVIER.
- 401 15. USDA/FSIS. Nationwide Sponge Microbiological Baseline Data Collection Program: Cattle.
402 [http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-](http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/baseline/baseline)
403 [reports/microbiology/baseline/baseline](http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/baseline/baseline). Consultado Oct 5, 2018.

- 404 16. Barrow, GI, Feltham, RKA. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria.
405 1993, 3rd ed., Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. p. 26.
- 406 17. Rahn, K, De Grandis, SA, Clarke, RC, Curtiss, R, Gyles, CL. Amplification of an *invA* gene sequence
407 of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of
408 *Salmonella*. *Molecular and cellular probes* 1992;6(271-279).
- 409 18. McDaniels, AE, Rice, EW, Reyes, AL, Johnson, CH, Haugland, RA, Stelma, GNJ. Confirmational
410 Identification of *Escherichia coli*, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate
411 Decarboxylase and β -D-Glucuronidase. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(9):3350-3354.
- 412 19. DebRoy, C, Roberts, E. Screening Petting Zoo Animals for the Presence of Potentially Pathogenic
413 *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest* 2006;18(6):597-600.
- 414 20. Bisi-Johnson, MA, Obi, CL, Vasaikar, SD, Baba, KA, Hattori, T. Molecular basis of virulence in
415 clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape,
416 South Africa. *Gut pathogens* 2011;3(9):
- 417 21. Grimont, PAD, Weill, F. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars.
418 <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>. Consultado Oct 5,
419 2018.
- 420 22. Popoff, MY, Le Minor, LE. (ed F: Rainey eds W. B. Whitman, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P.
421 DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh) 764-799 (John Wiley & Sons, Inc., 2015).
- 422 23. Ørskov, F, Ørskov, I. Serotyping of *Escherichia coli*. *Method Microbiol* 1984;14(43-112).
- 423 24. Clermont, O, Christenson, JK, Denamur, E, Gordon, DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing
424 method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep*
425 2013;5(1):58-65.
- 426 25. Eguale, T, Engidawork, E, Gebreyes, WA, Asrat, D, Alemayehu, H, Medhin, G *et al.* Fecal
427 prevalence, serotype distribution and antimicrobial resistance of Salmonellae in dairy cattle in central
428 Ethiopia. *BMC microbiology* 2016;16(20).
- 429 26. Sandt, CH, Fedorka-Cray, PJ, Tewari, D, Ostroff, S, Joyce, K, M'Ikanatha N, M. A comparison of
430 non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals using pulsed-field gel electrophoresis and
431 antimicrobial susceptibility patterns. *PLoS one* 2013;8(10):e77836.

- 432 27. Khen, BK, Lynch, OA, Carroll, J, McDowell, DA, Duffy, G. Prevalence and characteristics of
433 Salmonella in the beef chain in the Republic of Ireland. Zoonoses and public health 2014;61(8):534-
434 536.
- 435 28. Ballesteros-Nova, N, Rubio-Lozano, MS, Delgado-Suárez, EJ, Méndez-Medina, RD, Braña-Varela,
436 D, Rodas Suárez, O. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos Salmonella spp. aislados de carne
437 de res molida en la Ciudad de México. Salud Publica México 2016;58(3):1-7.
- 438 29. Rubio Lozano, MS, Martínez Bruno, JF, Hernández Castro, R, Bonilla Contreras, C, Méndez M, RD,
439 Núñez Espinosa, JF *et al.* Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica*
440 en carne de res en puntos de venta en México. Rev Mex Cienc Pecu 2013;4(1):107-115.
- 441 30. Signorini, M. Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. Nacameh
442 2007;1(2):118-141.
- 443 31. Cabrera-Díaz, E, Barbosa-Cardenas, CM, Perez-Montano, JA, Gonzalez-Aguilar, D, Pacheco-
444 Gallardo, C, Barba, J. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of salmonella in
445 ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. J Food Prot 2013;76(12):2004-2010.
- 446 32. Gutiérrez-Cogco, L, Montiel-Vázquez, E, Aguilera-Pérez, P, González-Andrade, MC. Serotipos de
447 Salmonella identificados en los servicios de salud de México. Salud Publica Mex 2000;42(6):490-495.
- 448 33. Zaidi, MB, Calva, JJ, Estrada-García, MT, León, V, Vázquez, G, Figueroa, G *et al.* Integrated Food
449 Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. Emerg Infect Dis 2008;14(3):429-435.
- 450 34. Habing, GG, Manning, S, Bolin, C, Cui, Y, Rudrik, J, Dietrich, S *et al.* Within-Farm Changes in Dairy
451 Farm-Associated Salmonella Subtypes and Comparison to Human Clinical Isolates in Michigan, 2000-
452 2001 and 2009. Appl Environ Microbiol 2015;81(17):5724-5735.
- 453 35. Webb, HE, Brichta-Harhay, DM, Brashears, MM, Nightingale, KK, Arthur, TM, Bosilevac, JM *et al.*
454 Salmonella in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. Frontiers in microbiology
455 2017;8(2214).
- 456 36. Scallan, E, Hoekstra, RM, Angulo, FJ, Tauxe, RV, Widdowson, M, Roy, SL *et al.* Foodborne Illness
457 Acquired in the United States—Major Pathogens. Emerg Infect Dis 2011;17(1):7-15.

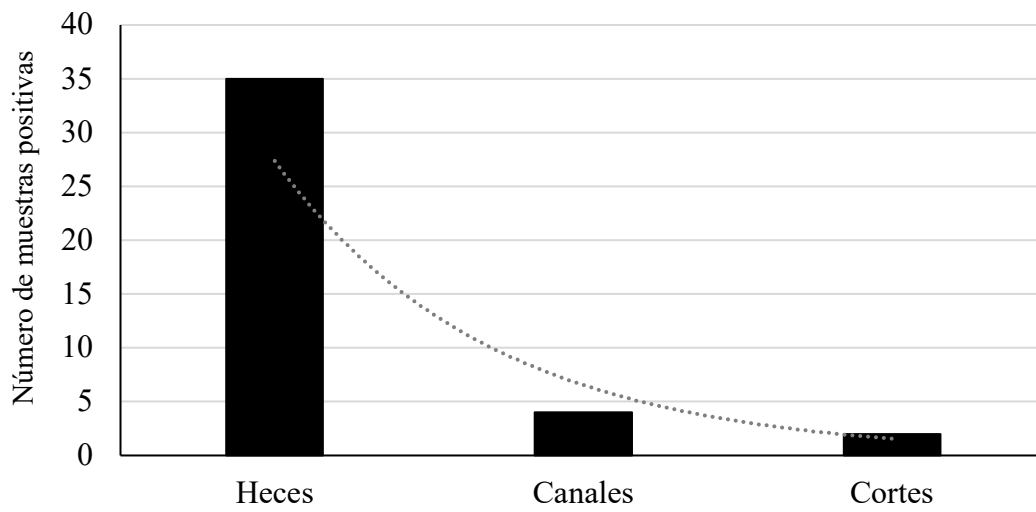
- 458 37. Gómez-Aldapa, CA, Díaz-Cruz, CA, Cerna-Cortés, JF, Torres-Vitela, MR, Villarruel-López, A,
459 Rangel-Vargas, E. *Escherichia coli* O157 in ground beef from local retail markets in Pachuca, Mexico.
460 J Food Prot 2013;76(4):680-684.
- 461 38. Gallegos, M, Morales, A, Álvarez, G, Vázquez, J, Morales, L, Martínez, I *et al.* Caracterización de
462 aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. Revista
463 Científica, FCV-LUZ 2009;XIX(2):139-146.
- 464 39. Chart, H, Okubadejo, A, Rowe, B. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and
465 *Yersinia enteocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. Epidemiology and infection
466 1992;108(1):77-85.
- 467 40. Navarro, A, Eslava, C, García de la Torre, G, León, LA, Licona, D, León, L *et al.* Common epitopes
468 in LPS of different Enterobacteriaceae are associated with an immune response against *Escherichia*
469 *coli* O157 in bovine serum samples. J Med Microbiol 2007;56(1447-1454).
- 470 41. Clermont, O, Olier, M, Hoede, C, Diancourt, L, Brisse, S, Keroudean, M *et al.* Animal and human
471 pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. Infection, genetics and
472 evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases
473 2011;11(3):654-662.
- 474 42. Carlos, C, Pires, MM, Stoppe, NC, Hachich, EM, Sato, MI, Gomes, TA *et al.* *Escherichia coli*
475 phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of
476 fecal contamination. BMC microbiology 2010;1(10):161.
- 477 43. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Multistate outbreak of shiga toxin-producing
478 *Escherichia coli* O145 infections (final update). <https://www.cdc.gov/ecoli/2012/o145-06-12/index.html>.
479 Consultado Oct 5, 2018.
- 480 44. Blanco, M, Blanco, JE, Mora, A, Dhahi, E, Alonso, MP, González, EA *et al.* Serotypes, virulence
481 genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in
482 Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). Journal of clinical microbiology
483 2004;42(2):645-651.
- 484 45. Bettelheim, KA. The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated
485 Pathogens. Crit Rev Microbiol 2007;33(1):67-87.

- 486 46. De Moura, C, Ludovico, M, Valadares, GF, Gatti, MSV, Leite, DS. Detection of virulence genes in
487 *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. Arq Inst Biol
488 2012;79(2):273-276.
- 489 47. Martínez-Castillo, A, Muniesa, M. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages
490 occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli*.
491 Front Cell Infect Microbiol 2014;4(46).
- 492 48. Hallewell, J, Niu, YD, Munns, K, McAllister, TA, Johnson, RP, Ackermann, HW *et al*. Differing
493 Populations of Endemic Bacteriophages in Cattle Shedding High and Low Numbers of *Escherichia coli*
494 O157:H7 Bacteria in Feces. Appl Environ Microbiol 2014;80(13):3819-3825.
- 495

496 Cuadro 1. Genes e iniciadores empleados para la caracterización molecular de *Salmonella* spp. y *E. coli*

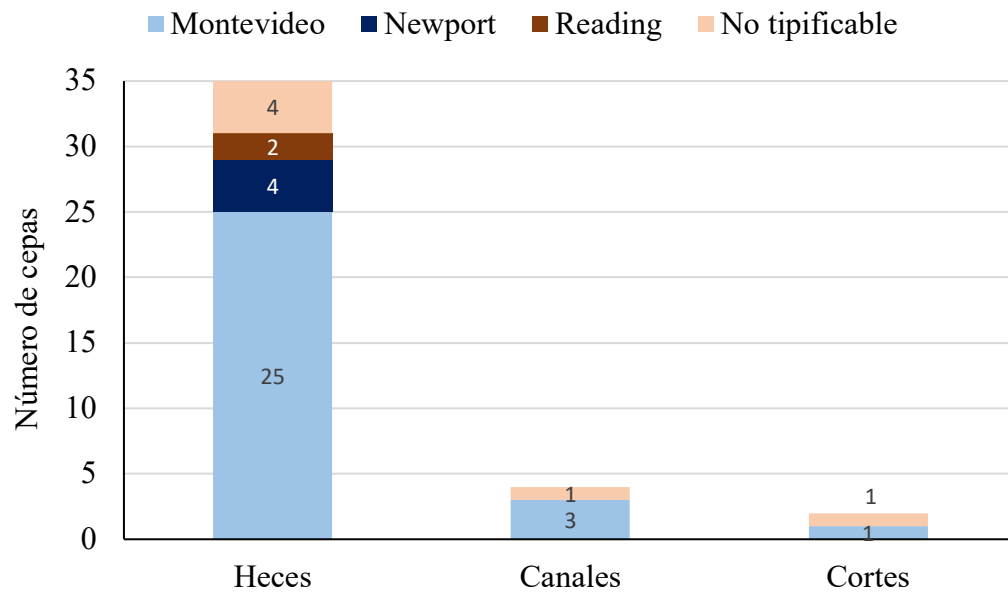
Patógeno	Gen	Fragmento amplificado (pb)	Secuencia de Iniciadores 5'→3'	Referencia
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	284	139 GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA 141 TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	(19)
<i>E. coli</i>	<i>gadA</i>	670	gadA1: ACCTGCGTTGCGTAAATA gadA2: GGGCGGGAGAAGTTGATG	(20)
	<i>eaeA</i>	890	EAE1: GTGGCGAATACTGGCGAGACT EAE2: CCCATTCTTTTTACCCGTCG	(21)
	<i>stx1</i>	582	STX1F: ACACTGGATGATCTCAGTGG STX1R: CTGAATCCCCCTCCATTATG	(21)
	<i>stx2</i>	255	STX2F: GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC STX2R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	(21)
	<i>estA</i>	190	STa-F CTAATGTTGGCAATTTTTATTTCTGTA STa-R AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTAA	(22)
	<i>eltA</i>	132	LT-1 AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA LT-2 GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	(22)
	<i>bfp</i>	324	EP1, CAATGGTGCTTGCGCTTGCT EP2, GCCGCTTTATCCAACCTGGT	(2)

497



498

499 Figura 1. Presencia de *Salmonella* spp. en heces, canales y cortes de bovino (n=100 por tipo
500 de muestra)

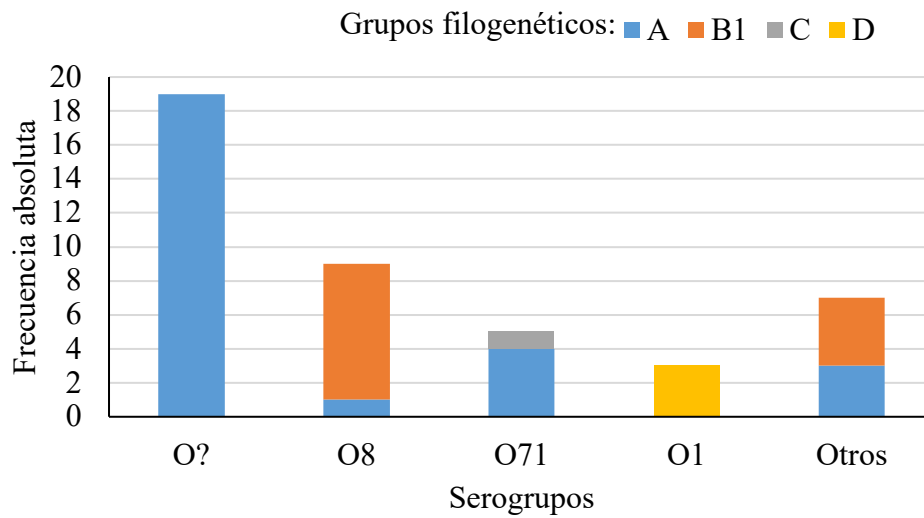


502 Figura 2. Distribución de serotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de acuerdo con el
 503 origen de la muestra (n=100 por tipo de muestra).

504 Cuadro 2. Frecuencia de serotipos de *E. coli* parcial o totalmente identificados por tipo de
 505 muestra

Tipo de muestra	n	Serotipo
Canal	1	O28ab:-
	3	-:H30
	1	-:H32
	3	O1:H6
	1	O113:-
	1	O154:H21
	1	O156:-
	1	O166:H21
	1	O32:-
	1	O6:-
	5	O8:-
	1	O8:H19
	1	O8:H2
	1	O8:H21
Pierna	1	-:H32
Pecho	1	O124:-
	1	O71:-
	2	O71:H12
	1	O8:H8
Falda	1	O7:H39
	2	O71:H12

506



507

508 Figura 3. Grupos filogenéticos de *E. coli*, según el esquema de Clermont⁽²⁶⁾, representados en

509 cada uno de los serogrupos identificados (n=43).