



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Caracterización fenotípica y genotípica del perfil de resistencia a  
antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con  
ganado bovino de engorda**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:

**TANIA BERENICE PALÓS GUTIÉRREZ**

TUTOR PRINCIPAL:

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

COMITÉ TUTOR

ANA LUISA RENTERÍA MONTERRUBIO  
FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

MARÍA DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



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.

## AGRADECIMIENTOS

A mi hija, por ser mi motor, y enseñarme que no hay adversidad suficiente para detenernos.

A mi mamá, por siempre estar ahí y darme todo el apoyo para la cumplir todas mis metas

A mi familia, por caminar siempre a mi lado.

A mi tutora, Dra. María de la Salud Rubio Lozano, por todo su apoyo incondicional, consejos y sobre todo por toda su paciencia.

Al Dr. Enrique Delgado, por su apoyo en mi crecimiento académico y todas sus asesorías.

Al todo equipo de trabajo de mi tutora, que colaboraron por horas en laboratorio y muestreos.

A los miembros de mi comité, Dra Pilar Castañeda y Dra Ana Luisa Renteria, por sus consejos, apoyo y evaluaciones durante mi formación.

## RESUMEN

*Salmonella* spp. es uno de los patógenos más importantes que provocan enfermedades transmitidas por alimentos. En México, hay reportes sobre la presencia de cepas de *Salmonella* en animales aparentemente sanos que entran a la cadena de producción de alimentos. El objetivo principal del presente estudio fue determinar la participación de los linfonodos en el aporte de *Salmonella* spp. en la carne molida, y conocer el perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antibióticos de cepas aisladas. Se muestrearon 400 bovinos comerciales, de los cuales se analizaron 1545 muestras, que incluyeron linfonodos superficiales y profundos, carne molida magra y con grasa. Las cepas aisladas de *Salmonella* spp. se sometieron a la prueba de susceptibilidad fenotípica a antibióticos y secuenciación completa del genoma, para la predicción *in silico* de serotipos y determinación del perfil de genes de resistencia. Los resultados mostraron una frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. del 5.0 % (n= 78). Los serotipos predominantes encontrados fueron Anatum (n = 23), Reading (n = 22), Typhimurium (n = 10) y London (n = 9). El 48 % de los aislamientos presentó resistencia a antibióticos, de estos 22% fueron MDR, siendo la resistencia a tetraciclina la más frecuentemente observada. En conclusión, los bovinos comerciales, aparentemente sanos, presentan linfonodos contaminados con cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos de importancia crítica según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Dichos resultados ofrecen la oportunidad de revisar la estrategia de uso de antibióticos en los procesos de engorda en México, y el impacto que esto puede tener sobre la salud pública.

## **Abstract**

*Salmonella* spp. it is one of the most important pathogens that cause foodborne disease. In Mexico, there are reports of the presence of *Salmonella* strains in apparently healthy animals along the food chain. The main objective of this study was to determine the roll of bovine lymph nodes in the contribution of *Salmonella* spp. in ground beef, and to know the phenotypic and genotypic profile of antibiotic resistance. 400 commercial cattle were sampled, of which 1545 samples were analyzed, which included superficial and deep lymph nodes, lean and fat ground beef. *Salmonella* spp. The phenotypic AMR profile was determined and the whole-genome sequencing for the prediction in silico of serotypes and determination of the profile of resistance genes. The results, show a frequency of contamination with *Salmonella* spp. 5.0% (n = 78). The predominant serotypes found were Anatum (n = 23), Reading (n = 22), Typhimurium (n = 10) and London (n = 9). 48%. About the isolates that presented antibiotic resistance, 22% were MDR, being resistance to tetracycline the most frequently observed. In conclusion, apparently healthy commercial cattle have lymph nodes contaminated with strains of *Salmonella* resistant to antibiotics of critical importance according to the World Health Organization (WHO). These results offer the opportunity to review the strategy for the use of antibiotics in the feedlot processes in Mexico, and the impact that this may have on human health.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Taxonomía del género <i>Salmonella</i> .....	9
2.1.1 Diferencias fenotípicas y genotípicas entre especies, subespecies y serotipos de <i>Salmonella</i> .....	9
2.2 Epidemiología de <i>Salmonella</i> .....	10
2.2.1 Serotipos especializados contra generalistas .....	11
2.2.2 Salmonelosis no tifoidea-- Serotipos de mayor relevancia en casos clínicos (humano.....	12
2.2.3 Bovinos como reservorios de cepas de <i>Salmonella</i> de importancia clínica.....	13
2.3 Sistema linfático y linfonodos.....	14
2.4 Patogénesis de <i>Salmonella</i> : adherencia, invasión, supervivencia y multiplicación intracelular.....	16
2.5 Islas de patogenicidad.....	19
2.6 Resistencia a antibióticos.....	21
2.6.1 Modificación enzimática: $\beta$ -lactamasas, enzimas modificadores de aminoglucósidos y enzimas modificadores de fenicoles.....	22
2.6.2 Bombas de eflujo .....	25
2.6.3 Resistencia por síntesis de enzimas alternativas o modificadores de la diana celular .....	25
2.6.4 Elementos genéticos móviles.....	26
<b>3 HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>4 OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>28</b>
4.1 Objetivos específicos.....	28
<b>5 MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
5.1 Diseño del estudio y determinación del tamaño de muestra.....	29

5.2	Toma de muestras.....	30
5.3	Análisis microbiológicos.....	32
5.4	Prueba de susceptibilidad a antibióticos.....	34
5.5	Secuenciación de aislamientos confirmados como <i>Salmonella</i> spp.....	37
5.5.1	Extracción de ADN genómico (gDNA) .....	37
5.5.2	Preparación de genotecas .....	38
5.5.2.1	Acondicionamiento del gDNA.....	38
5.5.2.2	Tagmentación.....	39
5.5.2.3	Indexado y amplificación .....	39
5.5.2.4	Purificación de PCR de muestras indexadas .....	40
5.5.2.5	Evaluación de la calidad.....	40
5.5.2.6	Normalización.....	41
5.6	Ensamble del genoma, predicción de serotipos y genes de resistencia a antibióticos (AMR).....	42
5.7	Análisis estadístico.....	42
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
6.1	Frecuencia de contaminación con <i>Salmonella enterica</i> .....	44
6.2	Efecto de la época de año en la contaminación con <i>Salmonella enterica</i> .....	45
6.3	Identificación de serotipo de <i>Salmonella enterica</i> y su relación con el tipo de muestra y época de año.....	45
6.4	Perfil fenotípico de resistencia de cepas de <i>Salmonella enterica</i> .....	46
6.5	Perfil genotípico de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Salmonella enterica</i> .....	51
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>

## Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Mecanismos de resistencia por modificación enzimática del antibiótico.....	24
Cuadro 2. Distribución de las 1545 muestras de carne y de linfonodos analizadas por estación y año* .....	31
Cuadro 3. Criterios para clasificación de cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a antibióticos .....	36
Cuadro 4. Frecuencia de contaminación con <i>Salmonella enterica</i> en muestras de carne y linfonodos de bovinos.....	44
Cuadro 5. Frecuencia de contaminación con <i>Salmonella enterica</i> por época de año en muestras de linfonodos y carne molida res .....	45
Cuadro 6. Distribución de serotipos de <i>Salmonella enterica</i> en muestras de linfonodos y carne molida de res.....	46
Cuadro 7. Perfil de resistencia fenotípica y genotípica de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de linfonodos superficiales y profundos .....	49
Cuadro 8. Perfil de resistencia fenotípica y genotípica de cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de carne magra molida y carne molida con grasa circundante de linfonodos.....	50

## Índice de Figuras.

Figura 1. Linfonodos superficiales de bovino: Derecha, LNS subilíaco. Izquierda, LNS cervical superficial. ....	15
Figura 2. Linfonodos profundos de bovino: Derecha, LNP celiaco. Izquierda, LNP axilar propio.....	16
Figura 3. Análisis de integridad de librerías para secuenciación de genoma completo de cepas aisladas de <i>Salmonella</i> en linfonodos y carne molida de bovinos. ....	41



## 1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los principales problemas de salud pública (Gutierrez-Cogco *et al.*, 2000; Poppe, 1998; Wray & Wray, 2000). *Salmonella* spp. es un grupo importante de patógenos causantes de ETA (WHO, 2017). Durante 2019, se reportaron en México más de 114,000 casos de salmonelosis, encontrándose en el lugar número 9 en causas de mortalidad (SSA, 2020). Aunado a esto, el uso inapropiado de antibióticos en animales y humanos ha acelerado la presencia de cepas resistentes a antibióticos (AMR) frecuentemente involucradas en ETA (Allen, 2013; Alos, 2015; Nair *et al.*, 2018). La evolución de la resistencia a antibióticos en *Salmonella* spp. no tifoidea (NTS) varía dependiendo del serotipo de NTS. Desde 1989, han emergido y se han distribuido mundialmente cepas de *Salmonella* spp. multi-resistentes (cloranfenicol, ampicilina y clotrimoxazol) (WHO, 2017).

La carne de diferentes especies, entre ellas la de bovino, funciona como reservorio de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Wilhelm *et al.*, 2017; Uribe y Suarez, 2006; Mead, 2005). Dentro de los reservorios de *Salmonella* de mayor importancia se encuentran los animales portadores asintomáticos. En este sentido, Delgado *et al.* (2019) confirmó la presencia de cepas de *Salmonella* provenientes de bovinos aparentemente sanos en México. Lo anterior es relevante ya que la carne de res es el segundo tipo de carne más consumida en México (FAOSAT, 2018). De hecho, entre 2012 y 2015, la carne de bovino estuvo implicada en diversos brotes de infecciones humanas por *Salmonella*, por lo que es considerada un foco importante

para la transmisión de este patógeno (CDC, 2016). Diversos estudios en México, con canales y carne molida de res, reportan frecuencias de contaminación con *Salmonella* entre 10 y 69 % (Miranda *et al.*, 2009; Pérez-Montaña *et al.*, 2012; Villalpando-Guzmán *et al.*, 2017; Rubio *et al.*, 2013; Cabrera-Díaz *et al.*, 2013). A lo largo del tiempo se ha pensado que la contaminación superficial de la canal es la causa más común de la contaminación de la carne molida (Doyle, 2013). Sin embargo, estudios recientes han revelado que *Salmonella* también está presente en los linfonodos, los cuales comúnmente son incorporados en la carne molida durante el proceso de elaboración, por lo que se ha sugerido que estos pudieran ser la principal fuente de contaminación en carne molida (Arthur *et al.*, 2008; Gragg *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015). Diversos autores reportan una alta variabilidad (4-91 %) en la incidencia del patógeno en linfonodos de bovinos, y hasta 8.3 % de los aislamientos obtenidos muestran multi-resistencia a antibióticos (Gragg *et al.*, 2013; Haneklaus *et al.*, 2012, Koohmariae *et al.*, 2012).

En México son escasos los estudios sobre el perfil de resistencia a antibióticos de las cepas que circulan en este nicho, tanto fenotípica como genotípicamente, esto es de gran relevancia epidemiológica, tomando en cuenta las altas tasas de positividad a *Salmonella* que se registran en carne molida de res en México. Por el profundo impacto que tienen, tanto en materia de salud pública como en la economía, las infecciones causadas por patógenos resistentes a antibióticos, resulta estratégico vigilar los perfiles de resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* presentes en la cadena alimenticia de México. Ello permitirá valorar

el riesgo que representan para la salud humana, así como identificar los determinantes genéticos y los mecanismos de diseminación de genes de resistencia en estas poblaciones. De esta forma, se facilitará la identificación de medidas de control, así como políticas de prevención efectivas.

## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Taxonomía del género *Salmonella***

*Salmonella* es un bacilo Gram negativo miembro de la familia enterobacteriaceae. Son microorganismos intracelulares facultativos, aerobio o anaerobio facultativo, oxidasa negativo y no esporulado. Generalmente son lactosa negativo, móviles y miden de 0.7 - 1.5 x 2 - 5 µm. La temperatura máxima de crecimiento es de 45. 6º C y se desarrolla en un rango de pH de 6.6 a 8.2 (Jawetz *et al.*, 2005). La mayoría produce gas por fermentación de carbohidratos, especialmente glucosa, con excepción de Typhi, Gallinarum y Pullorum. También producen catalasa y dan negativo en la prueba de citocromo oxidasa, reducen nitratos a nitritos y toleran altas concentraciones de sales biliares.

#### **2.1.1 Diferencias fenotípicas y genotípicas entre especies, subespecies y serotipos de *Salmonella***

*Salmonella* se clasifica en dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Basados en el perfil fenotípico, *S. enterica* es dividido en 6 subespecies (Enterica, Salamae, Arizonae, Diarizonae, Houtebae e Indica). La clasificación dada por el antígeno O, el flagelo y en algunos casos la cápsula resulta en la identificación de 30 serogrupos y más de 2500 serotipos (Tindall *et al.*, 2005; Gimont y Weill, 2007). Para la realización de estudios más detallados de taxonomía y patogenia, los serotipos pueden subdividirse mediante el establecimiento de biotipos (variación bioquímica entre organismos del mismo serotipo) y fagotipos (expresa diferente susceptibilidad a la lisis por bacteriófagos; Gutiérrez *et al.*, 2008). El esquema de

Kauffman - White se ha acreditado como la técnica más útil para la diferenciación de serovariedades. Esta técnica diferencia a los organismos en base a sus antígenos somáticos, capsulares y flagelares. La estructura antigénica presenta tres clases de antígenos:

- Antígenos somáticos (O). Forman parte del lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de la pared celular, son termoestables y alcohol-resistentes (Parra et al., 2002). Se conforma de 3 zonas: a) lípido A, zona más interna y con actividad tóxica intensa (endotoxina), b) polisacárido central, formado por varios azúcares de estructura poco común y c) cadena lateral o heteropolisacáridica, que se extiende hacia fuera del núcleo, proporciona especificidad.

- Antígenos flagelares H. Son de naturaleza protéica y termolábiles. La proteína estructural de los flagelos es la flagelina; por lo tanto, es un antígeno importante, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo de antígeno determinado en la región central (Parra et al., 2002).

Antígenos capsulares K. El único que se conoce es el antígeno VI, un polímero lineal del ácido alfa-1,4 que se encuentra en serotipos altamente invasivos Typhi, Paratyphi C y Dublín (Raffatellu et al., 2006).

## **2.2 Epidemiología de *Salmonella***

La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que cada año las ETA afectan a 1 de cada 10 personas, provocando 550 millones de enfermedades y 230,000 muertes (OMS, 2018). El Centro de Control de Enfermedades (CDC), estima que

anualmente hay 48 millones de enfermedades transmitidas por alimentos, de estas, 128,000 casos requieren hospitalización y mueren 3000. Los casos provocados por *Salmonella* ascienden a aproximadamente 1.2 millones al año (CDC, 2018). En México, la Secretaría de Salud (SSA) informó que las enfermedades gastrointestinales, ocupaban el 14<sup>o</sup> lugar, presentándose 60 casos de cada 100 mil habitantes (SSA, 2013). En 2019 se reportaron más de 114,000 casos de salmonelosis, encontrándose en el lugar número 9 en causas de mortalidad (SSA, 2019). La salmonelosis es más común en meses de verano, siendo la población de mayor riesgo niños menores de 5 años (CDC, 2007).

La fuente más frecuente de *Salmonella* son los alimentos contaminados (Caballero, 2008; Caffer et al., 2008, Weiler et al., 2017; Chuard, 2015). Los alimentos involucrados con mayor frecuencia son carne y sus derivados, donde la preparación y manipulación de los alimentos son factores claves (Poppe, 1998; Wray & Wray, 2000). A pesar de que se han implementado medidas de desinfección en la superficie de la canal de bovinos, la carne de res ha sido importante en la presentación de casos de salmonelosis (Li et al., 2015).

### **2.2.1 Serotipos especializados contra generalistas**

Los miembros del género *Salmonella* están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se los encuentra como comensales y como patógenos en el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y salvajes causando un amplio espectro de enfermedades en el hombre y en los animales (Adams y Moss, 2005). Dependiendo del grado de adaptación a un hospedero, el género *Salmonella* se

divide: 1) serotipos adaptados al hombre, rar vez afecta a animales. Sus representantes son Typhi, Paratyphi A, B, C y Sendai, 2) serotipos adaptados a animales (especialistas) tales como Pullorum y Gallinarum, Abortus–ovis, Abortus–equi, Choreleasuis, Dublín y 3) no adaptados a hospederos específicos (generalistas), estos se encuentran ampliamente distribuidos y predominan distintos serotipos. Los serotipos más comunes que causan infecciones en humanos son Enteritidis, Typhimurium, Newport y Javiana (OMS, 2017; CDC, 2014). Los serotipos de *Salmonella* emergentes más comunes son *Salmonella* Enteritidis en huevo y *Salmonella* Typhimurium DT104 en alimentos de origen animal (Wray & Wray, 2000, Weiler *et al.*, 2017; Puig *et al.*, 2011). González-Cogco *et al.* (2000) reportaron que los serotipos más comúnmente identificados en muestras clínicas fueron *S.* Typhimurium (20.4 %) y *S.* Enteritidis (18.3 %).

### **2.2.2 Salmonelosis no tifoidea-- Serotipos de mayor relevancia en casos clínicos (humanos y animales)**

Varios estudios han demostrado la presencia habitual de *Salmonella* en alimentos, y específicamente en carne se ha reportado con frecuencias que van desde un 4.2% en pollo, a un 13% en cerdo y un 40% en carne de res (Durango *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2009). También, Zahao *et al.* (2001) han encontrado frecuencias de 2 % de muestras positivas a *Salmonella* en carne. Con respecto a la carne molida, el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria mostró que la prevalencia en Estados Unidos de *Salmonella* fue de 2.4 %. En contraste, en varios países europeos se ha encontrado una mayor prevalencia, llegando hasta un 3.5 - 4.2 %

(Rhoades et al., 2009; Bonardi et al., 2017). En México, la frecuencia de contaminación que se ha reportado es mayor a las de EEUU y Europa. Diversos estudios mexicanos han reportado frecuencias de 10 hasta 32 % de *Salmonella* en canales (Miranda et al., 2009; Pérez-Montaña et al., 2012; Nayarit-Ballesteros et al., 2016) y del 20 al 68.5 % en carne molida (Cabrera-Díaz et al., 2013; Villalpando-Guzmán et al., 2017).

### **2.2.3 Bovinos como reservorios de cepas de *Salmonella* de importancia clínica**

Por mucho tiempo se ha considerado que las heces, la piel del ganado y en consecuencia la superficie de las canales son la fuente principal de contaminación de las canales. Pero, a pesar de aplicar medidas de intervención durante el procesamiento de las canales, la contaminación con *Salmonella* en carne sigue siendo muy elevada, lo que indica que existen otras fuentes de contaminación (Koochmariae et al., 2012). Estudios en los que evaluaron la contaminación con *Salmonella* en linfonodos, reportaron frecuencias de hasta 91 % y en muestras de carne de cerdo con linfonodos (ileocecal, rectal y cecal) se ha reportado una prevalencia de 13.8 % de *Salmonella* (Li et al., 2015; Haneklaus et al., 2012; Narváez-Bravo et al., 2013; Gragg et al., 2013; Methner et al., 2011). Se sabe que *Salmonella* logra colonizar el tejido linfoide subyacente al intestino, trasportándose de forma latente, principalmente en los ganglios linfáticos mesentéricos, logrando reactivarse después de procesos de estrés o inmunosupresión (Center for Food Security and Public Health, 2005; Barreto et al., 2016). Esto sugiere que los



linfonodos podrían ser una fuente potencial de contaminación con *Salmonella* en carne molida, ya que durante el proceso de molienda se agregan en la carne junto con la grasa.

### **2.3 Sistema linfático y linfonodos**

El sistema linfático es un complemento del sistema venoso y participa en la defensa del organismo. Los linfonodos (LN) son la unidad anátomo-funcional del sistema linfático que actúan como filtros reteniendo y fagocitando microorganismos que circulan por la linfa (Galotta *et al.*, 1981; Kunstmann, 2006). Los linfonodos son una de las primeras defensas del organismo contra infecciones, al albergar linfocitos, células dendríticas y macrófagos (Ghezzi, 2004; Tizard, 2009). Estructuralmente están formados por: a) una corteza periférica, donde predominan los linfocitos B, b) una médula central donde los linfocitos proliferan y se diferencian a células plasmáticas con producción de anticuerpos y c) una paracorteza, la cual es una región definida entre las dos anteriores donde predominan los linfocitos T y las células dendríticas (Tizard, 2009).

La principal función de los LN es responder a los antígenos presentes en los órganos que drenan, convirtiendo la inmunidad innata en respuestas adaptativas, facilitando así la interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos T y B, sensibles al antígeno (Tizard, 2009; Elgert, 2009). *Salmonella* tiene mecanismos que le permiten sobrevivir dentro de los macrófagos, lo que genera más probabilidad de encontrarse en los linfonodos y por lo tanto los animales, aparentemente sanos, pueden llegar al rastro portando el patógeno.

Dentro de los linfonodos palpables en bovinos, se encuentran el cervical superficial y el subilíaco. El LNS cervical superficial está situado cranealmente con respecto a la espalda, mide aproximadamente 9 cm y se encuentra recubierto por grasa. Son de mucha importancia en el examen clínico sistemático del animal. Las aferencias proceden de la piel del cuello, la espalda y de parte de la superficie lateral y ventral del tórax. El LNS subilíaco se localiza a unos 12 - 15 cm dorsal de la rótula. Los vasos aferentes se reciben de la piel de la región pelviana del muslo, de la pierna y a partir del abdomen y de la porción caudal del tórax (Figura 1). La importancia de estos linfonodos radica en que, por su ubicación anatómica entre las masas musculares, los hace tener más probabilidad de ser agregados en el proceso de molienda de la carne.



Figura 1. Linfonodos superficiales de bovino: Derecha, LNS subilíaco. Izquierda, LNS cervical superficial.

El LNP axilar propio se encuentra de 6 a 10 cm caudal a la articulación del hombro y caudal a la vena subescapular. Las aferencias proceden principalmente de los músculos de la espalda, brazo y antebrazo, músculos pectorales profundos, articulaciones del hombro y las codo-carpales (Sisson y Grossman, 1982). El LNP celíaco está situado a 7 - 10 cm de profundidad en una gran masa de grasa sobre el músculo gastrocnemio y entre el bíceps femoral y el semitendinoso. Las aferencias proceden de la piel de las porciones lateral, caudal y distal de la pierna (Figura 2). La importancia de estos linfonodos radica en que se sitúan dentro de la grasa ubicada entre los músculos de estas zonas, la cual es muy común que se agregue durante el proceso de preparación de la carne molida.



Figura 2. Linfonodos profundos de bovino: Derecha, LNP celíaco. Izquierda, LNP axilar propio

#### **2.4 Patogénesis de *Salmonella*: adherencia, invasión, supervivencia y multiplicación intracelular**

Después de la ingestión de agua y alimento contaminado, las bacterias que escapan la primera línea de defensa (pH gástrico), *Salmonella* inicia su ciclo de infección

invadiendo al hospedero a través del tejido linfoide, gracias a la penetración en eritrocitos y células epiteliales especializadas que recubren los nódulos linfáticos de las placas de Peyer. Posteriormente se dirige a células hospederas, que no son normalmente fagocíticas, como la superficie de la capa mucosa de las células epiteliales (Tükel *et al.*, 2006; Figueroa y Verdugo, 2005; Benenson *et al.*, 2001), donde pueden provocar cambios inflamatorios y destructivos de la mucosa del colon por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas (Hernández *et al.*, 2011). Se conocen 3 formas clínicas de salmonelosis en el humano: gastroenteritis (causada por *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), fiebre entérica (causada por *S. Typhi* y *S. Paratyphi*) y enfermedad invasiva sistémica (ocasionada por *S. Choleraesuis*), la dosis infectiva mínima para la mayoría de los serotipos es alrededor de  $10^5 - 10^6$  bacterias (Parra *et al.*, 2002; Caballero, 2008). Si bien, todos los serotipos pueden causar enfermedad en el ser humano, unos pocos son específicos de algunos huéspedes y pueden alojarse sólo en una o en unas pocas especies animales, por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Dublin en bovino, y *Salmonella enterica* serotipo Choleraesuis en porcinos (Coburn *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2012). Cuando esos serotipos particulares provocan la enfermedad en las personas suelen ser invasivos y pueden ser mortales (OMS, 2017).

Uno de los mecanismos de patogenicidad es la habilidad de engañar a la célula hospedera, mediante el sistema de secreción tipo III (SST3), codificado por la isla de patogenicidad 1 (SPI1). SST3 está dedicado a la traslocación de proteínas que permite la redirección de señales celulares de transducción que resulta en la

reorganización del citoesqueleto de la célula del hospedero, estableciendo nichos para la colonización (Sánchez y Carmona, 2003; Caballero, 2008). Cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las micro vellosidades circundantes se degeneran con elongación, edema y crecimiento de ruffling (solo invaden células M en ratones). La adhesión involucra varios tipos de fimbria que ayudan a la bacteria al contacto con el hospedero y permite interacción. La adhesión es un paso crítico en la supervivencia de *Salmonella*. El mecanismo inicial implica la unión inicial a receptores específicos de la superficie de la célula hospedera, seguida por la internalización (Wallis y Galyow, 2000). *Salmonella* puede invadir células fagocíticas y no fagocíticas, por medio de dos diferentes inyectosomas en la SPI 1 y 2, que al traslocarse sus efectores, permiten que la bacteria puede estructurar el citoesqueleto para ser internada y manipular las rutas de tránsito intracelular (Linke y Goldman, 2011).

El sistema de secreción tipo IV (SST4), en bacterias Gram negativas ayuda a la transferencia de DNA de una célula a otra (este evento es llamado conjugación), e incrementa la plasticidad del genoma ayudando a los microorganismos a la adaptación en los cambios del medio ambiente; también codifica plásmidos, establece la interacción hospedero-patógeno y/o transferencia de proteínas efectoras o complejos proteicos dentro del citoplasma de la célula del hospedero (Wallden *et al.*, 2010).

Otra característica de patogenicidad de *Salmonella* es la formación de biopelículas, este un método para el crecimiento y supervivencia que protege a la bacteria de

condiciones adversas del ambiente como limpieza y desinfección de las superficies de los alimentos. Carrasco *et al.* (2012) reportaron que el 78.3 % de las bacterias aisladas en diferentes tipos de alimentos tienen la capacidad de producir biopelículas. Otros autores mencionan que, en aislamientos de *Salmonella* obtenidos de carne de res, el 51.52 % tienen esta capacidad (Li *et al.*, 2017).

## **2.5 Islas de patogenicidad**

Los genes asociados con virulencia, también llamados islas de patogenicidad (SIP), que son largas agrupaciones de genes que codifican factores específicos de virulencia, se manifiestan en el proceso infeccioso. Tienen como característica que su porcentaje de G-C es menor del promedio del genoma bacteriano, y generalmente insertadas dentro de genes que codifican ARNt. Además, estas SIP portan genes que codifican factores de movilidad como integrasas, transposasas o secuencia de inserción. Hasta el momento se han reportado 19 islas de patogenicidad (SPI), aunque las más estudiadas son: SPI1, SPI2, SPI3, SPI4 y SPI5. A pesar de que cada isla es diferente, tienen en común que están adyacentes a genes de ARNt y delimitadas por secuencias repetidas de nucleótidos. Las SPI 1 y 2 son fundamentales para la infección y están relacionadas con la invasión de células epiteliales y supervivencia de *Salmonella* en el interior de los macrófagos (Barreto *et al.*, 2016; Figueroa y Verdugo, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007; Sánchez y Cardona, 2003; Hapfelmeier *et al.*, 2004).

La SPI 1 es una inserción de 40 Kb con un contenido de GC más bajo que el resto del genoma, es requerida para la invasión de células no fagocíticas mediante un

proceso que involucra la modificación del citoesqueleto o ruffling. Esta isla de patogenicidad está presente en todos los serotipos de *S. enterica*. La invasión depende de la actuación de sistema de secreción tipo 3 (SPI1-SST3), que inyecta en la célula eucariota efectores que interaccionan con los sistemas de señalización celular, forzando la entrada del patógeno, por lo que es necesaria para que se produzca la infección intestinal mediando la invasión de células no fagocíticas. Esta isla también participa en el proceso de replicación intracelular, interviene con la respuesta inmune del hospedero y algunos genes se relacionan con la formación de biopelículas (Sansoneetti, 2002; Sánchez y Cardona, 2003; Figueroa y Verdugo, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007; Hensel, 2004)

Algunas de las proteínas efectoras son (spt, genes sip) y proteínas reguladoras (*hilA*). Cuenta con dos grupos de genes que codifican la maquinaria de secreción: *inv - spa* y *prg - org*, estos genes codifican proteínas que cumplen funciones importantes durante la invasión de la mucosa, estas proteínas cumplen diferentes funciones para invadir la mucosa, involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de las células del hospedero (Figueroa y Verdugo, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007).

La SPI 2 es necesaria para los estadios subsecuentes de infección sistémica, relacionada con la capacidad de la bacteria de sobrevivir en el interior de macrófagos y de multiplicarse en los fagocitos. Codifica para un SST3 que se activa cuando la bacteria está en el interior de la célula hospedadora, traslocando proteínas efectoras a través de la membrana, desde el fagosoma hasta el citosol de

macrófago. La isla codifica alrededor de 32 genes, entre los que destacan un sistema de secreción y sus proteínas efectoras que regulan la replicación y supervivencia al interior de células epiteliales y fagocíticas, permitiendo que la bacteria pueda generar una infección sistémica (Barreto *et al.*, 2016; Schmidt y Hensel, 2004; Ohl y Miller, 2001).

## **2.6 Resistencia a antibióticos**

La resistencia a antibióticos por parte de las bacterias patógenas continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones. Se calcula que entre el 50-60% de las infecciones hospitalarias en los Estados Unidos son causadas por bacterias resistentes. La resistencia a antibióticos es el mecanismo por el cual, la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos, generado principalmente por el uso indiscriminado de los mismos en los humanos y en producciones animales. Es uno de los ejemplos más conocidos de adaptación rápida de las bacterias a un ecosistema que contenga estas moléculas, es considerada como amenaza creciente debido a la gran diversidad y volumen de los antimicrobianos, lo que ha facilitado la selección y dispersión de patógenos resistentes. Los genes de resistencia pueden ser de transmisión vertical (por descendencia), o de forma horizontal (entre bacterias). (Tafur *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2012). Aunque no está claro el origen de los genes de resistencia, probablemente se deben a los mecanismos de mutación que han permitido variaciones en genes esenciales, defendiendo a sus productos del ataque de determinados agentes (Rivera *et al.*, 2012). Otro factor que puede explicar la



resistencia, es la presencia de plásmidos de virulencia-resistencia en *Salmonella*, que codifican tanto factores de resistencia como factores de virulencia (Barreto *et al.*, 2016); puede tener un sustrato genético adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos (Rivera *et al.*, 2012).

Los mecanismos de resistencia podrían resumirse en 4 categorías: modificación enzimática del antibiótico ( $\beta$ -lactamasas), bombas de eflujo, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones en el sitio de acción. (French y Philips, 1997; Tafur *et al.*, 2008; Weiler *et al.*, 2017).

### **2.6.1 Modificación enzimática: $\beta$ -lactamasas, enzimas modificadores de aminoglucósidos y enzimas modificadores de fenicoles**

El mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactamasas, es la producción de enzimas específicos que se unen al antibiótico hidrolizándolo. Se han identificado más de 10 genes que codifican a  $\beta$ -lactamasas (*bla*): TEM, SHV, PSE, OXA entre otras. En *Salmonella* también se han encontrado enzimas OXA, con actividad contra oxacilinas o cloxacilinas. Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, son capaces de modificar grupos amino o hidroxilo, impidiendo la unión del antibiótico a la célula diana. Existen tres rutas por las cuales pueden inactivar, ATP-dependientes O-fosforilación por fosfotransferasas (genes *aph*), ATP- dependiente O-adenilación por nucleotidiltransferasas (genes *aadA*) y acetol CoA-dependiente (genes *aac*), (Cuadro 1). Esta modificación estructural impide que el antibiótico se una al ribosoma e inhiba la síntesis de proteína en la bacteria (Fuchs *et al.*, 1994; Davies y Wright, 1997). En *Salmonella*, los más comunes son *aadA*, *aadB*., *aphA*, *strA* y

*strB*. La resistencia a fenicoles se da mediante el mecanismo de enzimas modificadores de fenicoles, gracias a la inactivación enzimática mediante cloranfenicol acetil transferasas (Cat) A o B. En *Salmonella*, los más encontrados son *catA1* y *catA2*; *catB2*, *catB3* y *catB8* (Cuadro 1) (Guerra *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004; Pai *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Mecanismos de resistencia por modificación enzimática del antibiótico.

Clasificación	Mecanismo de acción	Genes	Antibiótico de resistencia
<b>β-lactamasas (<i>bla</i>)</b>			
	β-lactamasas que se unen al antibiótico hidrolizándolo	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> y <i>bla</i> <sub>TEM-135</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-3</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-131</sub>	Modifican penicilinas β-lactamasas de amplio espectro
<b>β-lactamasas de amplio espectro</b>			
		SHV, PER, CTX-M	Inactivan Oximinocelasporinas y monolactámicos Hidrolizan penicilinas, carbenicilinas
		CARB-2	Oxacilinas y cloxacilinas
		<i>AmpC</i>	Todos los β-lactámicos excepto carbapenemes
		CMY, ACC y DHA	
<b>Enzimas modificadores de aminoglucósidos</b>			
		O-adeniltransferasas	
		<i>aadA</i>	Estreptomicina y espectinomicina
	Modifican grupos amino o hidroxilo, impiden la unión del antibiótico a las proteínas ribosomales	<i>aadB</i>	Gentamicina, kanamicina y tobramicina
		N-acetiltransferasas	
		<i>aac 3</i>	Gentamicina
		O-fosfotranferasas	
		<i>aphA</i>	Kanamicina y neomicina
		<i>srtA</i> y <i>srtB</i>	Estreptomicina
<b>Enzimas modificadores de fenicoles</b>			
	activación enzimática de cloranfenicol-acetil transferasas	<i>catA</i>	Cloranfenicol

Fuente (Michael *et al.*, 2006; Weiler *et al.*, 2017, Fuchs *et al.*, 1994)

### 2.6.2 Bombas de eflujo

Son proteínas transportadoras de membrana, Pueden estar localizadas en el cromosoma o en elementos genéticos móviles (plásmidos). Estas bombas son el mecanismo de resistencia a tetraciclinas más eficiente de *Salmonella* (Marchetti *et al.*, 2011; Rodríguez, 2015).

- Bombas de expulsión de tetraciclinas. Se han encontrado 5 genes en *Salmonella*- *tetA*, *tetB*, *tetD*, *tetC* y *tetG*, codifican para bombas de expulsión asociadas a membrana (Michael *et al.*, 2006).
- Proteínas que expulsan fenicoles. La expulsión de cloranfenico / fenicol, se lleva a cabo mediante proteínas transportadoras específicas (*Cml* y *Flo*).

### 2.6.3 Resistencia por síntesis de enzimas alternativas o modificadores de la diana celular

- Resistencia a trimetopim. Mediada por la producción bacteriana de dihidrofolato reductasa (*dhfr*), el gen *dhfrA1* es el mas frecuente en *Salmonella*.
- Resistencia a sulfonamidas. *sul1*, *sul2* y *sul3* que codifican formas resistentes de la enzima dihidropteróico sintetasa, que interviene en la síntesis del ácido dihidropteróico, requerido para síntesis de bases nitrogenadas y aminoácidos, es el más distribuido dentro de serotipos de *Salmonella*.

- Resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas. Atribuida a mutaciones de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parE*, *parC*, que codifica para la subunidad de la DNA-girasa y es la diana primaria de las quinolonas (Guerra *et al.*, 2003).

#### **2.6.4 Elementos genéticos móviles**

Desempeñan un papel importante en la dispersión de la resistencia y en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos. Existen 3 mecanismos principales para la transferencia de genes: 1) conjugación (célula a célula) en la secuencia se codifican las funciones para la transferencia de ADN, 2) transducción mediada por bacteriófagos y 3) transformación génica (secuestra ADN del ambiente) requieren maquinaria de transferencia codificada por algún elemento conjugativo (MacGowan, 2017; Rodríguez, 2015). Todos son autónomos y auto transferibles, en su secuencia se encuentra toda la información necesaria. Dentro de los elementos genéticos más importantes, se encuentran los integrones, trasposones y plásmidos.

Los integrones son sistemas de clonación y expresión, participan en la captura y difusión de genes de resistencia entre bacterias (Cabrera *et al.*, 2006). Dependiendo de su naturaleza, pueden clasificarse en integrones de resistencia (RI) o integrones móviles y superintegrones (SI). Los RI, se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, contienen genes de resistencia a antibióticos; los SI se encuentran en el cromosoma y tienen una diversidad de funciones. En *S. enterica*, se han encontrado la clase 1, que codifican para la integrasa y la clase 2, menos frecuentes en *Salmonella* (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Los trasposones poseen la

maquinaria pueden hacer translocación desde un sitio donador a un receptor, sin la necesidad de homología entre ambos, los trasposones de clase 1 contienen genes de resistencia a antimicrobianos. Por último, los plásmidos son elementos genéticos extra cromosómicos con replicación autónoma, transfieren genes de resistencia mediante transmisión horizontal. Entre los más importantes en *Salmonella*, se encuentran los plásmidos R contienen genes de resistencia a antibióticos y a otros inhibidores de crecimiento (MacGowan, 2017; Chen *et al.*, 2016). Existen plásmidos de virulencia / resistencia que aportan ventaja adaptativa a cepas de *Salmonella*, haciéndolas más complicadas para su tratamiento. Se han descrito cepas que han acumulado genes de resistencia debido a la transferencia de plásmidos (Mendoza *et al.*, 2009; Briggs & Fratamico, 1999).

En resumen, la vigilancia integrada de patógenos entéricos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos tanto para la caracterización de la dinámica epidemiológica como para el monitoreo de resistencia a los antibióticos es esencial para generar planes de control, intervenciones, estrategias y políticas de prevención. Así mismo, es también de suma importancia para evaluar el impacto de programas de inocuidad de alimentos y generar evidencia científica para futuros estudios de investigación de campo y mecanismos de resistencia (Weiler *et al.*, 2017).

### **3 HIPÓTESIS**

La frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp., así como el perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antimicrobianos de las cepas obtenidas, estarán significativamente asociados con el tipo de muestra (linfonodos, carne molida) y la estación (cálida, fría).

### **4 OBJETIVO GENERAL**

Estimar la frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. en linfonodos y carne molida de res en México, así como el genotipo y fenotipo de resistencia de cepas de *Salmonella* spp. obtenidas.

#### **4.1 Objetivos específicos**

- Determinar la frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. en linfonodos superficiales y profundos y carne molida de ganado bovino en México.
- Determinar el efecto que tiene la ubicación anatómica de los linfonodos en la presencia de *Salmonella* y su correlación con la resistencia a antibióticos.
- Caracterizar por métodos fenotípicos y moleculares la resistencia a antibióticos de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de linfonodos y carne molida de res en México.

## 5 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.

### 5.1 Diseño del estudio y determinación del tamaño de muestra

El tamaño de muestra se calculó mediante la fórmula estadística para estimar una proporción de una población, cuando no conocemos el número de elementos en esa población.

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

n = tamaño de muestra

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

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

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

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

Bajo estos supuestos, se obtuvo un tamaño de muestra de 96, el cual se redondeó a 100 (LNS, LNP, CM y CG). El muestreo se replicó dos veces por año, durante dos años consecutivos, con dos etapas en cada año. Las muestras que se tomaron



entre abril y julio se designaron como muestras de estación “cálida”; mientras que las recolectadas entre septiembre y diciembre como muestras de estación “fría”.

Las canales provenían de bovinos machos enteros, cruza de *Bos indicus*, con una edad promedio de 24 - 36 meses, procesadas en un matadero Tipo Inspección Federal del estado de Veracruz y transportadas en refrigeración, durante aproximadamente 8 horas, hasta un punto de venta de la Ciudad de México. Una vez allí, las canales se mantuvieron en refrigeración durante dos días hasta la recolección de las muestras (72 - 96 horas *post mortem*). El punto de venta se visitó los lunes y/o martes de cada semana, hasta completar entre 5 y 10 canales por semana, según la cantidad de canales disponibles para muestrear.

## **5.2 Toma de muestras**

De cada canal se extrajeron linfonodos superficiales (LNS, cervical superficial y subiliaco) y linfonodos profundos (LNP, axilar propio y celíaco). La selección de linfonodos se hizo tomando en cuenta la probabilidad de que fueran incluidos en el proceso de molienda, por su ubicación anatómica.

Además de los linfonodos, se tomaron aproximadamente 200 g de carne magra (CM, 50 % del diezmillo y 50 % del sirloin, que son los que con más frecuencia se usan para producir carne molida) y de carne con grasa (CG), de las zonas circundantes de los LNS y LNP (aproximadamente 50 % de cada una). Previo a los análisis, las porciones individuales de cada tipo de muestra se combinaron para formar una sola muestra compuesta (o pool).

En algunas ocasiones, ciertas partes de la canal estaban comprometidas para la venta y no estuvieron disponibles para el muestreo. Por ello, no fue posible obtener todos los tipos de muestra del 100 % de las canales. Por consiguiente, la unidad de muestreo se definió como la muestra compuesta de LNS, LNP, CM y CG. En total, se recolectaron 1545 muestras de todas las fuentes en el período de dos años que duró el estudio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de las 1545 muestras de carne y de linfonodos analizadas por estación y año\*.

Tipo de muestra	Estación cálida <sup>1</sup>			Estación fría <sup>2</sup>		
	Año		Total	Año		Total
	2017	2018		2017	2018	
LNS	168	98	266	33	102	135
LNP	166	98	264	33	102	135
CM	130	98	228	33	102	135
CG	149	98	247	33	102	135
Total			1,005			540

<sup>1</sup>Abril - julio, <sup>2</sup>Septiembre – diciembre. LNS: linfonodos superficiales, LNP: linfonodos profundos, CM: carne magra, CG: carne con grasa.

\* Período de muestreo: 3 de abril de 2017 y el 14 de diciembre de 2018

Las porciones individuales de cada tipo de muestra se colocaron en bolsas plásticas estériles, previamente identificadas y se mantuvieron en hieleras con geles refrigerantes (aproximadamente a 4° C), para su envío al Laboratorio de Investigación II del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, lo que tomó dos horas como máximo.

### **5.3 Análisis microbiológicos**

La preparación de las muestras seguirá los lineamientos de la NOM-210-SSA-2014, con las siguientes modificaciones:

Los linfonodos se pesaron y, posteriormente, se sumergieron en agua hirviendo durante 5 s, con el fin de esterilizar su superficie. A continuación, se les agregó la mitad del agua peptonada tamponada (APT) (1286, Dibico, Cuautitlán, México) necesaria para alcanzar una dilución de 1:10 (8 g de LNP en 80 ml de APT y 25 g de LNS en 225 ml de APT) y se molieron durante 3 s en una licuadora Oster® previamente esterilizada. Las muestras molidas se vaciaron en una bolsa Stomacher® previamente identificada y con el resto del APT se arrastró el remanente que quedó en el vaso de la licuadora, para asegurar que todo el contenido se transfiriera a la bolsa Stomacher®, homogenizando la mezcla durante 1 min.

Para el análisis de las muestras de carne magra (CM), se tomaron 25 g y se molieron en una licuadora Oster® estéril durante 30 s. Posteriormente, el contenido se colocó en una bolsa de Stomacher® previamente identificada y se agregaron 225 ml de APT (1286, Dibico, Cuautitlán, México), homogenizando la mezcla durante 1 min. Por último, las muestras de carne con grasa (CG) se prepararon moliendo de manera conjunta en una licuadora Oster® estéril, durante 30 s, aproximadamente 1/3 de grasa y 2/3 de carne de las zonas circundantes de LNS y LNP (50 % proveniente de cada tipo de linfonodo). Después de la molienda se pesaron

asépticamente 25 g y se siguió el mismo procedimiento que para la carne magra.

Una vez procesadas todas las muestras, se dejaron reposar durante 2 h a temperatura ambiente para posteriormente ser incubadas a 36°C por 18-24 h. Después de la incubación, se agregaron 1000 µl del caldo de enriquecimiento en tubos con 10 ml de caldo selectivo para *Salmonella* Rappaport-Vassidialis (218581, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) para incubar a 41.5 °C por 24 h.

Posteriormente se sembraron 100 µL del homogenato de Rappaport-Vassidialis (218581, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) sobre placas de doble capa de agar xilosa, lisina, desoxicolato (XLD) y agar soya tripticaseina (TSA) (XLD/TSA) (XLD, 211741, Bioxon, Cuautitlán, México; TSA, 210800, Bioxon, Cuautitlán, México), elaboradas de acuerdo al método descrito por Wu y Fung (2001). La siembra se realizó por el método de agotamiento y posteriormente se incubaron a 37 °C por 24 ± 2 h.

Las cepas obtenidas fueron caracterizadas bioquímicamente según la NOM-210-SSA-2014. La toma de decisión fue según las características de cada medio: TSI: Fermentación negativa, producción de H<sub>2</sub>S (precipitado color negro), sin producción de gas; SIM: Motilidad positiva (salvo Gallinarum y Pullorum), producción de H<sub>2</sub>S; Citrato de Simmons: Positivo (coloración azul); Urea: Negativo (sin cambios).

La confirmación molecular de los aislamientos presuntamente positivos a *Salmonella* spp. se realizó mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR punto final), utilizando el gen *invA* (284 pb), según métodos

descritos previamente. El ADN se extrajo con el kit “Ez - 10 Spin Column Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit” (BioBasic Inc.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron los cebadores sentido (CGCCATGGTATGGATTTGTC) y contrasentido (GTGGTAAAGCTCATCAAGCG), en reacciones de PCR con un volumen total de 10  $\mu$ L, empleando los reactivos del MyTaq™ Mix (Bioline), con las siguientes concentraciones finales: 5  $\mu$ L de MyTaq™ Mix, 0.2  $\mu$ L de cada dNTP y 2.1  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Las condiciones de termociclado fueron: 94 °C / 3 min de desnaturalización inicial; posteriormente, 35 ciclos de desnaturalización, alineación y extensión (95 °C / 45 s, 62 °C / 30 s, 72 °C / 45 s, respectivamente) y 72 °C / 2 min de extensión final. Los productos de amplificación por PCR se procesaron por electroforesis en agarosa al 2 % con voltaje constante de 80 V por 50 min mientras que la visualización y digitalización de imágenes se realizó en un foto documentador Gel Logic 2200, con el software Care Stream. Los aislamientos confirmados se conservaron de dos modos. En el primero, se elaboraron inóculos de 1 mL tomando colonias frescas y mezclándolas en caldo Infusión-cerebro-corazón (BHI) (Bioxon, Cuautitlán, México) con 10 % de glicerol y se mantuvieron a – 70 °C en un ultracongelador. Por otra parte, se realizó un respaldo de los aislamientos en agar TSA (210800, Bioxon, Cuautitlán, México), almacenado a temperatura ambiente.

#### **5.4 Prueba de susceptibilidad a antibióticos**

El panel de resistencia fenotípica incluyó 13 antibióticos y se realizó según la prueba susceptibilidad por difusión en disco de Kirby - Bauer y los resultados se

interpretaron según los criterios del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012). Las cepas control usadas para la constatación de la técnica fueron: *Escherichia coli* ATCC 8739, *E. faecalis* ATCC 29212 y *P. aeruginosa* ATCC 9027. Para la clasificación de cepas multi-resistentes (MDR), se tomó en cuenta que resista a tres o más clases de antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012). La preparación del inóculo se realizó mediante suspensión directa de colonias (3 – 5), las cuales fueron suspendidas en solución salina y estandarizada a 0.5 de McFarland (aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). El inóculo se sembró por la técnica de extensión en superficie con un hisopo estéril en agar Mueller-Hinton (211667, Bioxon, Cuautitlán, México). Posteriormente se colocaron los sensidiscos (BD, Becton Dickinson and Company, MD) de antibióticos presionando para asegurar que el contacto completo con la superficie del agar. Los agares se incubaron a 35° por 16-18 h, finalmente se midieron las zonas de inhibición de crecimiento de cada antibiótico. Los antibióticos usados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (30µg), carbenicilina (100µg), imipenem (10µg), meropenem (15µg), ertapenem (10µg), ceftriaxona (20µg), cefotaxima (30µg), cefepime (30µg), amikacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacino (50µg), trimetroprim-sulfametoxazol (1.25µg), tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30µg). El Cuadro 3 muestra los criterios tomado para la clasificación de cepa resistente, susceptible o intermedia (CLSI, 2012). El criterio que se siguió para clasificar las cepas como MDR fue de cepas resistentes a  $\geq 3$  clases de antibióticos, según la publicación de Magiorakos *et al.* (2012).

Cuadro 3. Criterios para clasificación de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos

Antibiótico	Área de inhibición		
	Susceptible	Intermedia	Resistente
Aminoglucósidos			
Gentamicina (10 µg)	≥15	13-14	≤12
Amikacina (30 µg)	≥17	15-16	≤14
Carbapenemes			
Meropenem (15 µg)	≥23	20-22	≤19
Ertapenem (10 µg)	≥22	19-21	≤18
Imipenem (10 µg)	≥23	20-22	≤19
Cefalosporinas			
Cefepime (30 µg)	≥25	17-24	≤18
Cefotaxima (30 µg)	≥26	23-25	≤22
Ceftriaxona (30 µg)	≥23	20-22	≤19
Fenicoles			
Cloranfenicol (30 µg)	≥18	13-17	≤12
Flouroquinolonas			
Ciprofloxacino (50 µg)			
Inhibidores de la vía del folato			
Trim-sulfa (23.75 / 1.25 µg)	≥16	11-15	≤10
Penicilinas e inhibidores de β-lactamasas			
Amoxi./ác. Clav (20/10µg)	≥18	14-17	≤13
Carbenicilina (30 µg)	≥18	14-17	≤13
Tetraciclinas			
Tetraciclina (30µg)	≥15	12-14	≤11

Adaptado de Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012)

**AMK:** amikacina; **GEN:** gentamicina; **CB:** carbenicilina; **AMC:** amoxicilina-ácido clavulánico; **CTX:** cefotaxima; **CRO:** ceftriaxona; **FEP:** cefepime; **MEM:** meropenem; **ETP:** ertapenem; **IMP:** imipenem; **CHL:** cloramfenicol; **SXT:** trimetroprim-sulfametoxazol; **TE:** tetraciclina; **CIP:** ciprofloxacino

## **5.5 Secuenciación de aislamientos confirmados como *Salmonella* spp.**

### **5.5.1 Extracción de ADN genómico (gDNA)**

El gADN se extrajo utilizando el kit de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Systems, Inc., California, EE.UU.) a partir de 2 mL del cultivo celular en caldo BHI, el pellet celular se concentró mediante centrifugación a 13000 rpm / 5 min, el sobrenadante se eliminó para suspender el pellet en 500 µL de agua libre de nucleasas, nuevamente se concentró el pellet mediante centrifugación a 13000 rpm / 5 min, se eliminó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 200 µL de buffer PBS, posteriormente se adicionó 5 µL de lisozima (10 mg / mL), se mezcló con vórtex por 3 s e incubó a 37° C por 15 min.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se adicionaron 200 µL de buffer de unión y 40 µL de proteinasa K, se mezcló con vórtex 3 s e incubó a 70° C por 10 min; transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 10 µL de isopropanol y se mezcló con vórtex por 10 s. El líquido se transfirió a una columna de recolección colocada en un tubo colector de 2 mL, se centrifugó a 800 rpm / 1 min, se desechó el tubo colector y se colocó la columna en un tubo colector nuevo. Posteriormente se adicionaron 500 µL de buffer de remoción de inhibidores y centrifugó a 8 000 rpm / 1 min, se desechó el tubo colector con el sobrenadante y se colocó la columna en otro tubo colector nuevo para realizar lavados con 500 µL de buffer de lavado y se centrifugó a 800 rpm / 1 min, este paso se repitió dos veces.

La columna se colocó en un tubo Eppendorf® previamente identificado con el número de muestra y se adicionaron 100 µL de buffer de elución (calentado a 70°



C) en el centro de la columna sin tocarla, se dejó incubar por 3 minutos y se centrifugó a 8 000 rpm / 1 min. Se desecho la columna y se preservó el tubo en congelación a -20° C hasta su uso.

La cuantificación del gADN se realizó en un NanoDrop One (Thermoscientific, Madison, EE. UU. No. DE72905234), según las instrucciones del fabricante. Las extracciones que obtuvieron una concentración mínima de 40 ng /  $\mu$ L y una calidad 260 / 280 entraron al proceso de preparación de genotecas.

### **5.5.2 Preparación de genotecas**

La preparación de genotecas se realizó con el kit Nextera XT Library Prep v2 de Illumina, comenzando con 5  $\mu$ L de ADN a una concentración de 0.16 ng /  $\mu$ L. Para llegar a dicha concentración se llevó a cabo el acondicionamiento del ADN el cual se describe a continuación:

#### **5.5.2.1 Acondicionamiento del gDNA**

Se realizó una cuantificación del gADN inicial de mediante un fluorímetro Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), utilizando el kit Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermoscientific, Madison, EE.UU.). Posteriormente se realizó una primera dilución del gDNA, calculando la cantidad de agua libre de nucleasas requerida para lograr la concentración deseada con 5  $\mu$ L de gDNA. Una vez realizada la dilución se cuantificó nuevamente utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermoscientific, Madison, EE.UU.) para finalmente realizar una segunda dilución para llegar a la concentración de 0.16 ng /  $\mu$ L.

### **5.5.2.2 Tagmentación**

Una vez que se tuvo el gADN a la concentración requerida se siguió con la tagmentación, en este paso se realiza una fragmentación enzimática mediante transposasas, las cuales adicionan al mismo tiempo pequeños fragmentos complementarios a los índices. Se realizó con a partir de una concentración de ADN de 0.16 ng /  $\mu$ L. La preparación de reacción se realizó con las cantidades que se mencionan a continuación: 10  $\mu$ L Tagment DNA buffer (TD), 5  $\mu$ L de gADN (0.16 /  $\mu$ L), 5  $\mu$ L Amplicon Tagment Mix (ATM), posteriormente se le dio un vortex durante 5 y se centrifugó a 280 g / 1 min (Centrifuge 5430, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). Las condiciones para la tagmentación fueron de 55° C / 5 min, 10°C /  $\infty$  en un Termociclador Punto final (Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler, FisherScientific). Una vez que la muestra llegó a 10 °C se sacó inmediatamente del termociclador y se agregaron 5  $\mu$ L de buffer de neutralización (NT), posteriormente se le dio un Vortex durante 5 s y centrifugó a 280 g / 1 min para detener el efecto de la enzima.

### **5.5.2.3 Indexado y amplificación**

En este paso se realiza la unión de los índices que nos ayudaran a identificar las muestras durante la corrida de secuenciación, además de llevar a cabo una amplificación. El indexado de las muestras de gADN se realizó con el kit Nextera XT Index Kit V2, Set A, B y C. Al resultado de la reacción de tagmentación se le agregaron 5  $\mu$ L de cada índice asignado por muestra y 15  $\mu$ L de Nextera PCR Master Mix (NPM), se le dio Vortex durante 5 s y centrifugó a 280 g / 1 min. La

amplificación, se realizó en un Termociclador Punto final (Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler, FisherScientific), con las siguientes condiciones: 72 °C / 3 min; 95 °C / 30 s; 12 ciclos de: 95 °C / 10 s, 55 °C / 30 s, 72 °C / 30 s; 72 °C / 5 min. y 4 °C / ∞.

#### **5.5.2.4 Purificación de PCR de muestras indexadas**

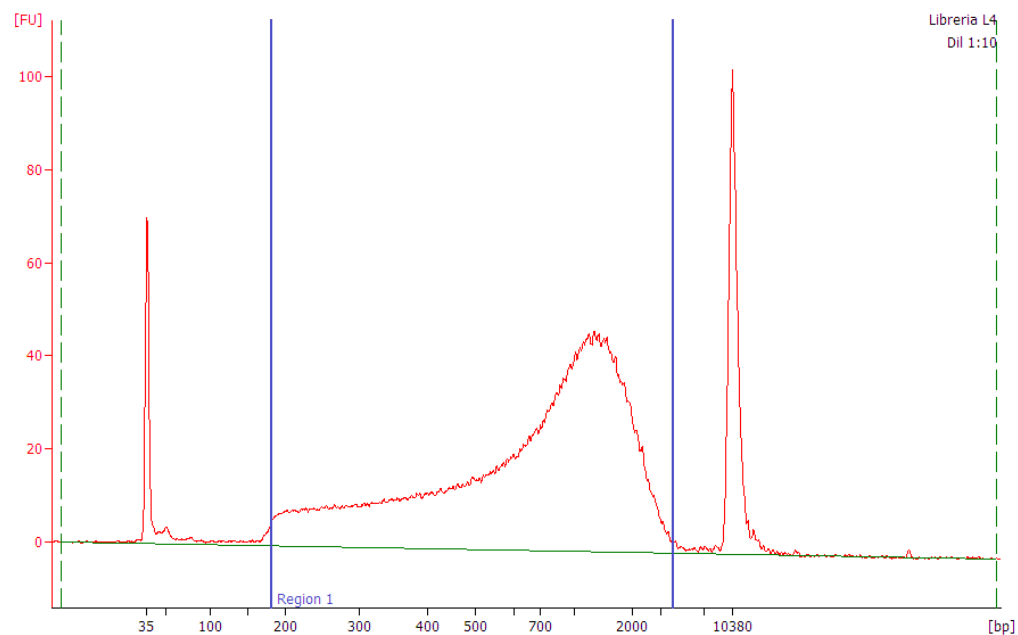
Al finalizar la reacción de amplificación se realizó el proceso de purificación de la PCR, en el cual vamos a seleccionar tamaños grandes (930-1100 pb). La purificación de la reacción de PCR se realizó con Perlas AmPure a una concentración 0.4x (para estandarizar a 1000 pb). Se tomaron 48 µL de cada muestra y se le adicionaron 19.2 µL de Perlas AmPure se le dio vórtex durante 5 s y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron dos lavados con 200 µL de etanol al 80% (EtOH 80 %), dejando incubar durante 30 s con el EtOH 80 % a temperatura ambiente, posteriormente se retiró todo el etanol de la reacción. Una vez realizados los lavados se agregaron 17.5 µL de buffer de resuspensión y finalmente se recolectaron 16 µL de cada muestra y se mantuvieron en refrigeración.

#### **5.5.2.5 Evaluación de la calidad**

Se evaluó la calidad de las genotecas mediante un Bioanalizador 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, U S). Se utilizó 1 µL de cada muestra utilizando los chips High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del proveedor. La visualización de los chips se realizó mediante el Software (Bioanalyzer 2100 Expert Software, Agilent

Technologies, Santa Clara, EE.UU.) (Fig sfjdf). La distribución del tamaño de las genotecas se realizó utilizando el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermoscientific, Madison, EE. UU.) (Figura 3).

Figura 3. Análisis de integridad de librerías para secuenciación de genoma completo de cepas aisladas de *Salmonella* en linfonodos y carne molida de bovinos.



### 5.5.2.6 Normalización

Una vez teniendo la concentración de gADN de cada genoteca, se realizó la normalización de las genotecas (2 nM), calculando la cantidad de buffer de re suspensión requerida y añadiendo 5  $\mu$ L de cada genoteca. Las genotecas normalizadas se colocan 5  $\mu$ L en una canaleta donde se mezclan para posteriormente transferir el pool a un tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 2 ml para cuantificar el pool (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermoscientific, Madison, EE. UU.).

Finalmente, se toma un volumen de la biblioteca estandarizada y se diluye en buffer de hibridación y se desnaturaliza a 96 °C/2 min, para evitar que entre ADN de doble cadena al secuenciador. Una vez realizado este paso, la muestra se carga en un cartucho MiSeq, realizando la corrida en el equipo de secuenciación, configurado para una profundidad estimada de 30x por muestra.

### **5.6 Ensamble del genoma, predicción de serotipos y genes de resistencia a antibióticos (AMR)**

Las lecturas crudas obtenidas de la secuenciación se utilizaron para predecir el serotipo, mediante análisis *in silico*, con ayuda del programa SeqSero. Este programa compara las secuencias problema contra una base de datos curada que contiene los determinantes genéticos de los antígenos somático y flagelar de *Salmonella enterica*, empleados en el esquema de Kauffmann-White. El ensamble del genoma se realizó mediante el servidor web PATRIC. La predicción del grupo O se realiza con base en el cluster *rfb*, que codifica la síntesis de este antígeno, así como en los genes codificantes de las enzimas flipasa (*wzx*) y polimerasa (*wzy*). Por su parte, el antígeno flagelar se predice a partir de los genes *fliC* y *fliB*, que codifican las flagelinas de fase 1 y 2, respectivamente. La identificación de genes se realizó mediante el Software ResFinder 3.1.0 (2018).

### **5.7 Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para determinar si existía asociación entre el tipo de muestra, la época del año y el serotipo de *Salmonella* en la frecuencia de contaminación. En caso de observar asociación significativa, se utilizó la razón de

probabilidades para estimar los factores que tienen mayor influencia en la tasa de contaminación de las diferentes matrices estudiadas. Los datos se analizaron con el programa Statgraphics Centurion XV (StatPoint, Inc.).

## 6 RESULTADOS

En general, se observó una frecuencia de contaminación con *Salmonella* spp. del 5.0 %, con 78 aislamientos obtenidos a partir de las 1545 muestras analizadas en los dos años (Cuadro 2).

### 6.1 Frecuencia de contaminación con *Salmonella enterica*

Los linfonodos superficiales, seguidos de la grasa circundante de los linfonodos, mostraron el mayor número de aislamientos positivos de *Salmonella enterica*. Se observó una fuerte asociación entre el tipo de muestra y la positividad al patógeno ( $\chi^2 = 23.7$ ,  $P < 0.0001$ ), con una mayor probabilidad de encontrar muestras positivas en LNS que en las demás fuentes: razón de probabilidades 3.2, intervalo de confianza al 95 % (IC95) 2.0-5.0,  $P < 0.0001$  (Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia de contaminación con *Salmonella enterica* en muestras de carne y linfonodos de bovinos

Fuente*	Positivos	Negativos	Total	Frecuencia
LNS	39	366	405	2.52
LNP	10	385	395	0.65
CM	11	352	363	0.71
CG	18	364	382	1.16

\* LNS, linfonodos superficiales, LNP: linfonodos profundos, CM: carne magra molida, CG: carne molida con grasa circundante de los linfonodos

## 6.2 Efecto de la época de año en la contaminación con *Salmonella enterica*

La frecuencia de contaminación con *S. enterica* estuvo significativamente asociada con la época del año ( $\chi^2 = 20.3$ ,  $P < 0.0001$ ). La probabilidad de encontrar muestras positivas en la estación cálida fue 4.7 veces mayor (IC95 2.2-9.8,  $P < 0.0001$ ) que en la fría. Las frecuencias de positividad por matriz analizada y por estación se resumen en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Frecuencia de contaminación con *Salmonella enterica* por época de año en muestras de linfonodos y carne molida res

Fuente*	Estación cálida			Estación fría		
	Positivo	Negativo	Total	Positivo	Negativo	Total
LNS	34 <sup>a</sup>	232	266	1	132	135
LNP	9 <sup>b</sup>	255	264	5	134	135
CM	11 <sup>b</sup>	217	228	0	135	135
CG	16 <sup>b</sup>	231	247	2	133	135
Total	70	935	1005	8	532	540

\* LNS, linfonodos superficiales, LNP: linfonodos profundos, CM: carne magra molida, CG: carne molida con grasa circundante de los linfonodos

## 6.3 Identificación de serotipo de *Salmonella enterica* y su relación con el tipo de muestra y época de año

El serotipo de *Salmonella enterica* también estuvo asociado con el tipo de muestra ( $\chi^2 = 43.8$ ,  $P = 0.0025$ ) y durante la temporada cálida. Predominando el serotipo *S. enterica* serotipo Reading ( $n = 21$ ) seguido por *Salmonella* Anatum ( $n = 20$ ), ambos



aislados en su mayoría de linfonodos, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium sólo se aisló en muestras de carne (n = 11). La única cepa del serotipo Give se aisló de LNS en la estación fría. En general, la diversidad de serotipos fue mayor en los aislamientos obtenidos de ambos tipos de linfonodos que en carne magra o con grasa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Distribución de serotipos de *Salmonella enterica* en muestras de linfonodos y carne molida de res.

Serotipo de <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>								
Fuente*	Anatum	Fresno	Give	Kentucky	London	Muenster	Reading	Typhimurium
<b>Estación cálida</b>								
LNS	13	2	1	5	4	-	7	-
LNP	2	-	-	-	4	-	3	-
CG	5	1	-	-	1	-	5	4
CM	-	-	-	1	-	-	4	6
<b>Estación fría</b>								
LNS	3	-	-	-	-	-	2	-
LNP	-	-	-	-	-	-	1	-
CG	-	1	-	-	-	1	-	-
CM	-	-	-	-	-	-	-	-

\* LNS, linfonodos superficiales, LNP: linfonodos profundos, CM: carne magra molida, CG: carne molida con grasa circundante de los linfonodos

#### 6.4 Perfil fenotípico de resistencia de cepas de *Salmonella enterica*

Cerca de la mitad de los aislamientos (48 %) presentaron resistencia a por lo menos a un antibiótico, 24 % fueron clasificados como multi-resistentes (MDR) y 52 % fueron pan-susceptibles. Por antibiótico individual, la mayor tasa de resistencia se

observó en tetraciclina (43 %), seguida de carbenicilina (23 %), cloramfenicol (17 %) y trimetoprim-sulfametoxazol (12 %). Los perfiles de MDR más comunes incluyeron la tri-resistencia a betalactámicos, cloramfenicol y tetraciclinas (CB/AMC/CHL/TET, n=6), así como la tetra-resistencia a betalactámicos, cloramfenicol, sulfonamidas y tetraciclinas (CB/CHL/SXT/TET, n=4) predominando *S. Typhimurium* (Cuadro 7 y 8). La frecuencia de cepas MDR estuvo asociada con el tipo de muestra ( $\chi^2 = 20.3$ ,  $P < 0.0001$ ), con una probabilidad 3.7 veces mayor (IC95 1.4-9.6,  $P=0,0034$ ) de encontrar cepas MDR en aislamientos de carne que en los linfonodos.

Además, los resultados sugieren la presencia de beta-lactamasas en 22 aislamientos. Entre estos, un total de 12 parece portar betalactamasas resistentes al ácido clavulánico, ya que resistieron la amoxicilina-ácido clavulánico. Otras cinco cepas resistieron cefalosporinas de tercera y/o cuarta generación; mientras que un aislamiento parece portar betalactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos. Por último, ninguno de los aislamientos mostró resistencia a fluoroquinolonas; mientras que la resistencia a los aminoglucósidos solo apareció en dos aislamientos, uno que fue resistente a amikacina y uno a gentamicina (Cuadro 7 y 8).

Se encontraron 17 aislamientos de LN superficiales que fueron resistentes a por lo menos un antibiótico, siendo la quinolona el antibiótico que mostró mayor resistencia (n = 8), seguido por tetraciclina (n = 6) y 8 aislamientos fueron MDR, siendo

CB/AMC/TET el perfil más frecuente (Cuadro 7). En el uso de los LN profundos, solo se encontraron 2 aislamientos, ambos resistentes a tetraciclina y quinolona

Cuadro 7. Perfil de resistencia fenotípica y genotípica de cepas de *Salmonella* aisladas de linfonodos superficiales y profundos

Fuente	Estación	Cepa	Perfil de resistencia	N	S/MDR	a CIP	AMRg
LNP	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
LNP	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
LNS	Cálida	Fresno	TET	1	Mono		<i>mdsAB, tetC</i>
LNS	Cálida	Fresno	TET	1	Mono		<i>mdsAB, tetC</i>
LNS	Cálida	London	SXT	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
LNS	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
LNS	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
LNS	Cálida	Reading	CRO	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7</i>
LNS	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7</i>
LNS	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
LNS	Cálida	Anatum	SXT/TET	2	Bi		<i>mdsAB, tetB</i>
LNS	Cálida	Anatum	AMC/CRO/MEM/ETP/IPM/SXT	6	MDR		<i>mdsAB</i>
LNS	Cálida	Give	CB/AMC/CHL/SXT/TET	5	MDR	qnr	<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, catA2, sul1, dfrA12, qacEDelta1, qnrA1, tetA</i>
LNS	Cálida	N/I	CB/AMC/TET	3	MDR		<i>mdsAB, aph(3)-Ia, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, sul2, blaTEM-1, tetB</i>
LNS	Cálida	Kentucky	CB/CHL/SXT/TET	4	MDR	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
LNS	Cálida	Kentucky	CB/CHL/SXT/TET	4	MDR	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
LNS	Cálida	Kentucky	CB/CHL/SXT/TET	4	MDR	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
LNS	Cálida	London	CB/CTX/CHL/TET	4	MDR	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
LNS	Cálida	N/I?			MDR		<i>blaCMY-83, qnrB10</i>

Linfonodos superficiales (LNS), linfonodos profundos (LNP). **AMK**: amikacina; **GEN**: gentamicina; **CB**: carbenicilina; **AMC**: amoxicilina-ácido clavulánico; **CTX**: cefotaxima; **CRO**: ceftriaxona; **FEP**: cefepime; **MEM**: meropenem; **ETP**: ertapenem; **IMP**: imipenem; **CHL**: cloramfenicol; **SXT**: trimetoprim-sulfametoxazol; **TE**: tetraciclina; **CIP**: ciprofloxacino.

De los aislamientos de carne magra molida, 10 presentaron resistencia a por lo menos un antibiótico y de estos, 7 fueron MDR siendo CB/AMC/CHL/TET el perfil más frecuentemente encontrado siendo S Typhimurium el serotipo predominante. Para los aislamientos de la carne molida con grasa circundante de linfonodos, 9 cepas fueron resistentes a por lo menos 1 antibiótico, 4 fueron MDR, un aislamiento MDR S. Typhimurium presentó resistencia a 8 antibióticos (GEN/CB/AMC/CRO/CHL/SCT/CIP/TET) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Perfil de resistencia fenotípica y genotípica de cepas de *Salmonella* aisladas de carne magra molida y carne molida con grasa circundante de linfonodos.

Fuente	Estación	Cepa	Perfil de resistencia	N	S/MDR	ACIP	AMRg
CG	Cálida	Anatum	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
CG	Cálida	Fresno	TET	1	Mono		<i>mdsAB, tetC</i>
CG	Cálida	Reading	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
GBL	Cálida	Kentucky	CTX	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19</i>
GBL	Cálida	Reading	CRO	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7</i>
CG	Fría	Fresno	TET	1	Mono		<i>mdsAB, tetC</i>
CG	Fría	Muenster	TET	1	Mono	qnr	<i>mdsAB, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, qnrB19, tetA</i>
CM	Cálida	Reading	SXT/TET	2	Bi	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7</i>
CG	Cálida	Reading	CB/CHL/SXT/TET	4	MDR	qnr	<i>mdsAB, qnrB19, fosA7.7, tetC</i>
CG	Cálida	Typhimurium	GEN/CB/AMC/CRO/CHL/SCT/CIP/TET	8	MDR		<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CG	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/SXT/TET	5	MDR		<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CG	Cálida	Typhimurium	AMK/CB/AMC/CHL/TET	5	MDR		<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR,</i>

CM	Cálida	Reading	CB/CHL/SXT/TET	4	MDR	<i>sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/TE	4	MDR	<i>mdsAB, fosA7.7, tetC</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/SXT/TET	5	MDR	<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/SXT/TET	5	MDR	<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/TET	4	MDR	<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/TET	4	MDR	<i>mdsAB, aadA2, blaCARB-2, floR, sul1, qacEDelta1, tetG</i>
CM	Cálida	Typhimurium	CB/AMC/CHL/TET	4	MDR	<i>mdsAB, blaCARB-2, sul1, qacEDelta1</i>

Carne molida con grasa de linfonodos (CG), carne magra molida (CM). **AMK**: amikacina; **GEN**: gentamicina; **CB**: carbenicilina; **AMC**: amoxicilina-ácido clavulánico; **CTX**: cefotaxima; **CRO**: ceftriaxona; **FEP**: cefepime; **MEM**: meropenem; **ETP**: ertapenem; **IMP**: imipenem; **CHL**: cloramfenicol; **SXT**: trimetoprim-sulfametoxazol; **TE**: tetraciclina; **CIP**: ciprofloxacino.

## 6.5 Perfil genotípico de resistencia a antibióticos de cepas de *Salmonella enterica*

Así como en el perfil fenotípico de resistencia, las cepas aisladas de las muestras de carne presentaron un perfil más amplio de presencia de genes comparado con las cepas obtenidas de las muestras de linfonodos.

En general, el genotipo de resistencia se correspondió con los resultados de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Las cepas con perfil MDR portaban una mayor cantidad de genes de resistencia en comparación con aquellas que

manifestaron mono y bi-resistencia, así como con las pan-susceptibles (Cuadro 7 y 8).

No obstante, en casi todas las clases de antibióticos hubo cepas que mostraron resistencia a pesar de que no portaban alguno de los genes de resistencia conocidos en su genoma. Tal es el caso de siete cepas que resistieron tetraciclina, diez que resistieron alguno de los tres tipos de betalactámicos, seis que resistieron cloranfenicol y nueve que resistieron trimetoprim-sulfametoxazol. En contraste, aunque se observó una amplia distribución de genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (*qnrB19* y *qnrA1*), los aislamientos mostraron resistencia intermedia a ciprofloxacino.

Los genes más ampliamente distribuidos fueron *mdsA*, aun en aislamientos pan-susceptibles. Este gen codifica una proteína de fusión de membrana de la familia RND (resistance – nodulation - cell división) de bombas de eflujo de antibióticos y *mdsB*, que codifica una proteína transportadora del mismo sistema de eflujo (Bradford, 2001). Los genes que codifican para resistencia a tetraciclinas identificados en las cepas (*tetABCG*), codifican factores de resistencia por eflujo activo (McDermott *et al.*, 2018). En resistencia a betalactámicos, el gen más frecuentemente detectado fue *blaCARB-2*, que confiere resistencia a penicilinas; mientras que una cepa portaba un gen codificante de la betalactamasa de amplio espectro *blaTEM-1*, que confiere resistencia contra penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro (tercera y cuarta generación) (McDermott *et al.*, 2018). En cuanto

a los carbapenémicos, no se encontraron metalobetalactamasas en ninguna de las cepas.

Todas las cepas de *S. Typhimurium* aisladas de carne con grasa circundante de linfonodos mostraron la presencia de por lo menos un gen de resistencia para tetraciclina (*tetB*, *tetC*, *tetG*) y aminoglucósidos (*Aaa(6)-la*, *Aaa(6)-ly*), únicamente 3 / 18 aislamientos mostraron genes para fenicoles (*florR*) y sulfonamidas (*sul1*, *sul2*). Las cepas de la carne molida con grasa circundante de linfonodos; a pesar de haber presencia de genes para aminoglucósidos, ninguna cepa mostró resistencia fenotípica a esta clase de antibiótico. Por otro lado, una cepa *S. London* aislada de carne con grasa, no expresó ningún gen de resistencia, sin embargo, presentó resistencia fenotípica a  $\beta$  - lactámicos, tetraciclina y cloranfenicol (Cuadro 8).

En los aislamientos de los linfonodos, los genes más frecuentemente encontrados fueron aquellos que codifican resistencia a quinolonas (*qnrB-19*) y aminoglucósidos (*Aaa(6)-la*) (37 / 39 y 20 / 39, respectivamente), sin embargo, de todos los aislamientos obtenidos, únicamente una cepa *S. Anatum* aislada de LNS, mostró resistencia fenotípica a aminoglucósidos y ninguna a quinolonas. Solo 11 / 38 cepas expresaron genes para tetraciclinas (*tetC* y *tetR*), de las cuales 5 no presentaron resistencia fenotípica a este antibiótico. El único aislamiento *S. Give*, aislado de LNS durante la estación fría mostró el perfil más amplio de genes (*aac6-laa*, *qnrB19*, *tetA*, *tetR*, *CARB-2*, *Dfra12*) (Cuadro 7).

La presencia génica de las cepas aisladas en los linfonodos profundos fue menor, siendo los genes para aminoglucósidos los de mayor presencia (*aac6-laa* y *qnrB19*),



solo una cepa *S. Kentucky* mostro genes contra aminoglucósidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas (*aac6-laa*, *qnrB19* y *tetB-P*) (Cuadro 8).

## 7 DISCUSIÓN

En este estudio se encontró una frecuencia de contaminación con *Salmonella* relativamente baja comparando con lo reportado por diversos autores, quienes mencionan frecuencias de contaminación en carne molida de 16 - 68 % (Cabrera-Díaz *et al.*, 2013; Ballesteros-Nova, *et al.*, 2016) y en linfonodos de 50 - 94 % (Gragg *et al.*, 2013; Belk *et al.*, 2018; Nickelson *et al.*, 2019). Se puede confirmar, que los bovinos aparentemente sanos pueden ser reservorio de diversos serotipos de *Salmonella*, algunos de ellos de importancia clínica, tales como Typhimurium, Kentucky y Reading. Se ha comprobado que *Salmonella* Enteritidis causa infecciones sin signos clínicos en animales domésticos aparentemente sanos, y son capaces de diseminar la infección a otros animales o contaminar la carne (Gutiérrez *et al.*, 2008; Belk *et al.*, 2018). A pesar de que se han realizado estrategias para prevenir las infecciones asintomáticas con *Salmonella* en el ganado, no se han tenido buenos resultados, estudios previos han evaluado el efecto sobre la frecuencia de *Salmonella* en linfonodos de bovinos de engorda con el uso de vacunas basadas en genes involucrados en la captación de hierro, mineral con un papel central en el proceso infeccioso, sin embargo, no han encontrado resultados positivos (Cernicchiaro *et al.*, 2016). Otra prueba realizada con ganado Holstein inoculado con *Salmonella* y suplementados con tilosina en el alimento, no mostró un resultado positivo, ya que lograron aislar el patógeno a partir de los linfonodos de los animales (Holzer *et al.*, 2017). Debido a las fallas en los intentos por controlar el patógeno en los animales de producción, el monitoreo de infecciones subclínicas

en corrales de engorda, podría ser el mejor método para separar animales portadores y, de esta forma, limitar la diseminación del patógeno.

Este trabajo confirma lo reportado en estudios previos, en lo relativo a las mayores tasas de contaminación con *Salmonella* que se observan en linfonodos superficiales (Brichta-Harhay *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2015). Es evidente la habilidad de *Salmonella* para invadir y sobrevivir en el tejido linfoide del hospedero (Arthur *et al.*, 2008; Gragg *et al.*, 2003). Se ha confirmado la presencia de *Salmonella* en la linfa de ovinos 24 h después de ser inoculados con cepas de *Salmonella* (50 uL, con una concentración de 10<sup>9</sup> log), confirmando que existe un transporte pasivo después de la inoculación, siendo los monocitos CD 14 los más importantes para el transporte de la bacteria, de igual forma encontraron que *Salmonella* provoca una afluencia linfática de granulocitos, contribuyendo así el transporte hacia los linfonodos (Bonneau *et al.*, 2006).

La contaminación de las muestras de carne molida puede explicarse a que existe una contaminación cruzada al adicionar la grasa circundante a los linfonodos a la carne molida, aún si ésta se encuentra en niveles muy bajos de contaminación (Brichta-Harhay *et al.*, 2012). Las bacterias presentes en los LNP (popíleo y preescapular) pueden contaminar la carne y la canal (Lepovetsky *et al.*, 1953; Brichta-Harhay *et al.*, 2012).

Para entender el efecto de contaminación cruzada al adicionar la grasa de los linfonodos, la canal se puede contaminar con el contenido intestinal durante el faenado; es decir, si hay contaminación de la canal durante el proceso de trimeado,

puede existir una contaminación cruzada hacia la superficie de los linfonodos o al tejido circundante a la grasa, aun si existen niveles muy bajos de contaminación (Brichta-Harhay *et al.*,2012). Un estudio realizado por Cabrera-Días *et al.* (2013) colectando muestras de carne molida en carnicerías de tres diferentes municipios en el estado de Jalisco, observaron una frecuencia de contaminación de 56.7 %, los autores relacionaron los altos porcentajes de contaminación, principalmente a que en los rastros no tienen control sobre la contaminación con heces de la canal, o no existe un control de refrigeración para la fabricación de la carne molida. Por otro lado, la presencia de hemolinfonodos en el tejido graso, los cuales podrían contribuir a la contaminación, considerando la habilidad de *Salmonella* de diseminarse por el sistema linfático. Todos estos resultados, muestran que la práctica de agregar linfonodos y/o grasa circundante al proceso de molienda de la carne de res, puede ser un factor en el aumento de la incidencia de contaminación con *Salmonella* en la carne molida, por lo que la modificación (extrayendo o no usando linfonodos) al proceso de molienda podría resultar en una disminución en la frecuencia de contaminación con *Salmonella* en la carne molida.

Los resultados confirman observaciones previas con respecto al aumento en la contaminación con *Salmonella* en linfonodos durante el verano (Bosilevac *et al.*, 2009; Cabrera-Diaz *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2015). Se ha mencionado que existen diversos factores ambientales causantes de esta variabilidad (plagas, vida salvaje, temperatura, precipitación), y, se ha sugerido que la mayor incidencia de picaduras de moscas y de otros insectos en el verano podría ser un factor determinante

(Olafson *et al.*, 2016; Belk *et al.*, 2018). Sin embargo, aún se requieren de más estudios para determinar el factor determinante de la estacionalidad en la presencia de *Salmonella*.

Epidemiológicamente, conocer los serotipos circulantes en casos tanto en humanos como en animales, es un punto clave para generar información actual sobre los serotipos circulantes y de mayor impacto. Previamente se han reportado diversos serotipos en muestras de carne y linfonodos, , *S. Reading* y *Anatum* han sido asociados predominantemente a LNS (Belck *et al.*, 2019; Nickelson *et al.*, 1029; Arthur *et al.*, 2008). En general, el predominio de *S. Anatum* y *S. Typhimurium* en linfonodos confirma observaciones previas con respecto al aumento en la contaminación con *Salmonella* en linfonodos durante el verano (Cabrera-Diaz *et al.*, 2013). Un problema alarmante es que *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son las de mayor relevancia epidemiológica y en salud pública, muy asociados con casos de gastroenteritis en humanos a nivel mundial (CDC, 2019), y además el principal serotipo aislado en muestras clínicas en México es *S. Typhimurium*, manteniéndose en un índice constante a través de los años entre 13 y 15 % (Gutiérrez *et al.*, 2000). El serotipo *S. Kentucky* también se ha asociado con infecciones en humanos y animales en Estados Unidos, Gragg *et al.* (2013), lograron aislaron con mayor frecuencia este serotipo en diferentes plantas de sacrificio en México. La diversidad de serotipos encontrados en este estudio, muestran la necesidad de continuar investigando las poblaciones de *Salmonella* de origen no clínico, mostrando la importancia de dar un seguimiento a los factores de contaminación con *Salmonella*

en la carne molida asociadas con producción animal, por su papel como reservorio de infecciones humanas. Por lo general, la distribución relativa de los serotipos suele ser muy variable en muestras no asociadas con casos clínicos. Sin embargo, no debemos descartar la importancia de estas cepas como reservorio de infecciones humanas, tomando en cuenta que algunas de ellas (Typhimurium, Kentucky, Reading) suelen estar involucradas en infecciones humanas y animales.

La alta frecuencia (46 %) de cepas de *Salmonella* resistentes a por lo menos un antibiótico, muestra un panorama preocupante. La resistencia a antibióticos en los aislamientos obtenidos constituye un riesgo para la salud humana y conlleva a un problema en la práctica de la medicina veterinaria (Cameron y McAllister, 2016). Internacionalmente se ha reconocido que la carne molida y los linfonodos son una fuente importante de cepas MDR, se ha llegado a reportar hasta 97% de *Salmonella* resistentes a por lo menos un antibiótico y hasta 21 % a dos o más antibióticos. (Fluckey *et al.*, 2007; Bosilevac *et al.*, 2009; Brichta *et al.*, 2011; NARMS, 2015). A pesar de que en México se han aislado cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos de linfonodos con una frecuencia de 68%; y en carne molida se ha reportado una frecuencia 34.4 – 54 % (Miranda *et al.*, 2009; Cabrera-Diaz *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2019). Se ha demostrado la presencia de *Salmonella* en animales aparentemente sanos y animales con una infección previa por *Salmonella* MDR, y se sabe que existe una alta correlación entre el uso de antibióticos en animales para consumo humano y la presencia de cepas resistentes en muestra de

alimento de origen animal (Muños-Vargas *et al.*, 2017; Chantziaras *et al.*, 2014; Fluckey *et al.*, 2007).

A pesar de que el patrón de resistencia y serotipo difieren según la fuente de aislamiento, se comprueba que tanto los linfonodos como la carne molida son reservorios de *Salmonella* resistente a por lo menos un antibiótico. Este trabajo confirma la amplia diseminación de resistencia a tetraciclinas en cepas de *Salmonella*, y la presencia de genes que codifican la resistencia mediada por bombas de eflujo, como el mecanismo predominante, evidencia la presión positiva de selección sobre estos genes, derivada del empleo sistemático de tetraciclinas en la producción animal. A pesar de que la frecuencia de cepas MDR en LNP (12 %), se encuentra dentro del rango de 6.4 – 16.6 % reportada en estudios previos, esto debe ser de interés en el gremio veterinario ya que implica un riesgo en la salud humana (Gragg *et al.*, 2013; Arthur *et al.*, 2008). Dentro de los patrones de resistencia encontrados en LNP, *S. Reading* presenta la más alta frecuencia de resistencia a por lo menos un antibiótico (principalmente a tetraciclina). Según El Sistema Nacional de Monitoreo de Resistencia a Antibióticos de Estados Unidos de América (NARMS, por sus siglas en inglés) la resistencia a tetraciclina es la más frecuente entre los aislamientos de *Salmonella* en carne molida, seguido por estreptomicina, y aminoglucósidos. Como se ha mencionado con anterioridad, se ha demostrado que tetraciclina es el antibiótico con mayor resistencia en muestras de LNP, desde 1992, las oxitetraciclinas de larga acción han sido usadas como medicación profiláctica en becerros que arriban a corrales de engorda, lo que sigue

siendo algo común hasta el día de hoy; acompañado de la práctica común de la sub-dosificación, ha generado una alta resistencia en cepas de *Salmonella* (Van Donkersgoed, 1992; Abell *et al.*, 2017; Cetin *et al.*, 2019; Cameron and McAllister *et al.*, 2016; NARMS, 2012). A raíz de los resultados de este estudio, es importante considerar el hecho de modificar las prácticas habituales en los corrales de engorda para enfrentar este aumento en la resistencia de *Salmonella* a esta clase de antibiótico. Para lograr cambiar las prácticas habituales sobre el uso de antibióticos con fines profilácticos, es importante revisar la regulación sobre el empleo de antibióticos en la producción animal, y así lograr tomar medidas de gestión de riesgos.

En relación al perfil de multi-resistencia (MDR), las cepas con un perfil más amplio fueron *S. Typhimurium* aisladas de carne molida y *S. Reading* de LNP. En general los aislamientos obtenidos de la carne fueron las que presentaron la mayor frecuencia de MDR (55 %). Estudios en México, han reportado frecuencias de MDR de hasta 27.4 %, predominando los serotipos *S. Anatum*. *S. Typhimurium*, ha mostrado regularmente patrones altos de resistencia en muestras de humanos y alimento de origen animal; llegando casi hasta el 100 % de las cepas aisladas de ganado bovino ser MDR (Cabrera-Díaz *et al.*, 2010; Zaidi *et al.* 2008; Afema *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014).

En general, los aislamientos MDR en este estudio, fueron similares a los reportados por diversos autores en México y en otros países, siendo principalmente a tetraciclina, carbenicilina, cloramfenicol, y trimetropim-sulfametoxazol (Zaidi *et al.*,



2006; Cabrera-Díaz *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2009; NARMS, 2006; Brichta *et al.*, 2011). Como se ha demostrado en trabajos anteriores, estas cepas se están diseminando a lo largo de las cadenas productivas (Delgado *et al.*, 2018). Por tanto, el riesgo que representan para la salud humana, al fungir como reservorios de infecciones humanas causadas por patógenos multi-resistentes. El perfil encontrado en México, de MDR entre los aislamientos de *Salmonella* se incluye estreptomycin, tetraciclina y ampicilina, lo cual es muy similar al encontrado en nuestro estudio (Zaidi *et al.*, 2006; Cabrera-Díaz *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2009). Sin embargo, NARMS reporta como un perfil MDR mucho más amplio, que incluye la combinación de resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclina (ACSSuT) (NARMS, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, *S. Typhimurium* aisladas de muestras de carne molida, mostraron el perfil más alto de resistencia (amoxicilina, carbenicilina, tetraciclina, sulfametoxazol y cloranfenicol). Es importante considerar el impacto de estos perfiles de resistencia, ya que cloranfenicol, ciprofloxacino y sulfatropim-sulfametoxazol, a su vez son los antibióticos usados como primera opción en el tratamiento de la salmonelosis en humanos. En México, el 100 % de los estudios han mostrado resistencia a estreptomycin y tetraciclina (Miranda *et al.*, 2009; Perez-Montaña *et al.*, 2012; Nayarit-Ballesteros *et al.*, 2015; Novoa-Farías *et al.*, 2015).

Se sabe que existen diversos factores que contribuyen a la resistencia a antibióticos por parte de *Salmonella*. Uno de ellos, es el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en ganado bovino, y se les atribuye un aumento en la presión de

selección y expresión de genes que codifican resistencia a antibiótico en cepas de *Salmonella* (Cameron and McAllister, 2016). También, la presencia diversa de genes, podría indicar que juegan un rol importante en la presentación de la resistencia fenotípica por parte de *Salmonella* (Varela-Guerrero *et al.*, 2013).

Algo importante de destacar, es que el 48 % de las cepas portaban el gen de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (*qnrB19* y *qnrA1*) a pesar de presentar susceptibilidad al antibiótico. El gen *qnrB19* confiere bajo nivel de resistencia (Delgado *et al*, 2018). Sin embargo, esto no implica que la cepa sea susceptible. Ante un desafío clínico, estos genes podrían sobre expresarse y conferir resistencia, complicando enormemente la terapéutica de la infección (Varela-Guerrero *et al.*, 2013).

## 8 CONCLUSIÓN

Este estudio confirma que bovinos aparentemente sanos presentan linfonodos contaminados con *Salmonella*, evidenciando el potencial de contaminación de la carne molida al adicionar los linfonodos al momento de preparar la carne molida, sobre todo en las épocas más cálidas del año. La predominancia de positividad del patógeno en las muestras analizadas revela que tiene un patrón estacional con preferencia hacia el clima cálido, probablemente por las condiciones ambientales o el aumento de vectores que podrían jugar un papel en la transmisión del patógeno. A pesar de la diversidad de serotipos obtenidos, *S. Typhimurium* fue específico en muestras de carne, mientras que Anatum y Reading predominaron en muestras de linfonodos. Las cepas que circulan en linfonodos y carne destinados a consumo humano presentan resistencia fenotípica y genes de resistencia contra antibióticos de importancia crítica según la OMS. Lo anterior muestra el impacto negativo que esto puede tener en la salud pública, por lo que es muy importante mejorar las regulaciones vigentes, con el fin de promover el uso responsable de antibióticos en animales de producción.

## 9 BIBLIOGRAFÍA.

1. Alikhan NF, Zhou Z, Sergeant MJ, Achtman M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. PLoS Genet. 2018;14(4):e1007261.
2. Abell KM, ME Theurer, RL Larson, BJ White and M Apley, 2017. A mixed treatment comparison meta-analysis of metaphylaxis treatments for bovine respiratory disease in beef cattle. J. Anim. Sci. 2017.95:626–635
3. 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.
4. Afema JA, AE Mather and WM Sisco, 2014. Antimicrobial Resistance Profiles and Diversity in *Salmonella* from Humans and Cattle, 2004–2011. Zoonoses and Public Health. 62:506–517.
5. Allen HK, UY Levine, T Looft, M Bandrick and TA Casey, 2013. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. Trends in Microbiology; 21(3):114-119.
6. Alós JI, 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enferm Infecc Microbiol Clin;33(10):692-699.
7. Arthur TM, JM Bosilevac, DM Brichta-Harhay, N Kalchayanand, DA King, ST Shackelford, TL Wheeler and M Koohmaraie, 2008. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Contamination In The Lairage

- Environment Ar Comercial U.S. Beef Processing Plants And Identification Of An Effective Intervention. *Journal Of Food Protection*; 71(9):1752-1760.
8. 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 Pública México*. 2016;58(3):1-7.
  9. Balleste-Delpierre C, Sole M, Domenech O, Borrell J, Vila J, Fabrega A. Molecular study of quinolone resistance mechanisms and clonal relationship of *Salmonella enterica* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(2):121-
  10. Belk AD, Arnold AN, Sawyer JE, Griffin DB, Taylor TM, Savell JW, et al. Comparison of *Salmonella* Prevalence Rates in Bovine Lymph Nodes across Feeding Stages. *J Food Prot*. 2018;81(4):549-53.
  11. Bhagwat A. Rapid Detection Of *Salmonella* From Vegetable Rinse-Water Using Real-Time PCR. *Food Microbiol* 2004;21:73-78.
  12. Bonardi S, I Bruini, R Magnami, N Cannistra y F Brindani, 2017. Low Prevalence Of *Salmonella* Enterica In Cull Dairy Cattle At Slaughter In Northern Italy. *Italian Journal of Food Safety*; 6:61-72.
  13. Bonneau M, M Epardaud, F Payot, V Niborski, MI Thoulouze, F Bernex, B Charley, S Riffault, LA Guilloteau and I Schwartz-Cornil, 2006. Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of *Salmonella* from tissue to draining lymph node. *J. Leukoc. Biol*. 79: 268–276.

14. Bosilevac JM, MN Guerini, N Kalchayannand and M Koohmaraie, 2009. Prevalence and Characterization of *Salmonellae* in Commercial Ground Beef in the United States. *App. And Env. Microbiology*;5(7):1892–1900.
15. Bou G, OA Fernández, C García, NJA Sáes y S Valdezate, 2011. Metodos De Identificación Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología. *Enferm. Infecc. Clin*; 29(8):601-608.
16. Bradford PA, 2002. Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2002;9:33-951.
17. 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):854-8.
18. Cabrera-Diaz 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):2004-10.
19. Cameron A and TA McAllister, 2016. Antimicrobial usage and resistance in beef production. *J. of Animal Science and Biotechnology.* 7;68:1-22
20. Carrasco E, A Morales-Rueda, RM García-Gimeno, 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45 (2012) 545–556

21. CDC. Outbreak of *Salmonella* Infections Linked to Ground Beef. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [citado diciembre 2019]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/newport-10-18/index.html>.
22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic Resistance Threats in the United States. 2013. Available online: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (acceso: 16 Mayo 2019).
23. *Salmonella* Newport infections linked to ground beef produced by JBS Tolleson, Inc. <https://www.cdc.gov/salmonella/newport-10-18/index.html>. [\(Acceso Feb 2020\)](#).
24. Cetin E, Serbetcioglu T, Temelli S, Eyigor A. Nontyphoid *Salmonella* carriage, serovar profile and antimicrobial resistance phenotypes in slaughter cattle. *Journal of Food Safety*. 2018;39(2).
25. Cernicchiaro N, Ives SE, Edrington TS, Nagaraja TG, Renter DG. Efficacy of a *Salmonella* Siderophore Receptor Protein Vaccine on Fecal Shedding and Lymph Node Carriage of *Salmonella* in Commercial Feedlot Cattle. *Foodborne Pathog Dis*. 2016;13(9):517-25.
26. Chuard DV, 2015. Caracterización De Mecanismos Involucrados En La Resistencia A Cefalosporina De Tercera Generación En Aislamientos Clínicos De *Salmonella* Enterica No Typhi Aisladas en Santa Fe en el año 2014. XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores, 14 y 15 de octubre de 2015, Santa Fe, Argentina

27. Chatham-Stephens K, Medalla F, Hughes M, et al. Emergence of Extensively drug-resistant *Salmonella* Typhi infections among travelers to or from Pakistan-United States, 2016-2018. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2019;68:11-13. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6801a3External>
28. Delgado-Suárez EJ, Selem-Mojica N, Ortiz-López R, Gebreyes WA, Allard MW, Barona-Gómez 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.
29. Edrington TS, Loneragan GH, Genovese K, Hanson DL, Nisbet DJ. *Salmonella* Persistence within the Peripheral Lymph Nodes of Cattle following Experimental Inoculation. J Food Protect. 2016;79(6):1032-5.
30. Elgert K. 2009. Understanding the Immune System. Chapter 2, Cells and Organs of the Immune System. Second edition. Wiley-Blackwell. USA.
31. Fabrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol Rev. 2013;26(2):308-41.
32. Figueroa OIM y RA Verdugo., 2005. Mecanismos Moleculares De Patogenicidad De *Salmonella* sp. Rev Latinoam Microbiol; 47(1-2):25-42.
33. Fratamico PM and TP Strobaugh, 1998. Simultaneous Detection Of *Salmonella* Spp And Escherichia O157:H7 By Multiplex PCR. Journal Of Industrial Microbiotechnology; (21):92-98.
34. FUCHS LY, Conde M, Gonzalez VM, Noquez AH, Calderon E y Avonce N 1994, Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. Salud Pública de México 36:4;428-438. ISSN 1606-7916. Disponible en:



<<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5775/6410>>. Fecha de acceso: 12 mayo 2020

35. Fluckey, W. M., W Loneragan, R. Warner, and M. M. Brashears. 2007. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from cattle feces, hides, and carcasses. *J. Food Prot.* 70:551–556.
36. Galotta D. R., Stover E., Galotta J.M. (1981) Guía orientativa de angiología..U.B.A. Buenos Aires Argentina
37. Ghezzi MD, 2004. Ontogenia del sistema Linfatico. Tesis de postgrado, Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias.
38. Gonzalez-Cogco L, E Montiel-Vazquez, P Aguilera-Perez y MC Gonzalez Andrade, 2000. Serotipos De *Salmonella* Identificados En Los Servicios De Salud De México. *Salud Publica De México*; 42(6):490-495.
39. González FT y HRA Rojas, 2005. Enfermedades Transmitidas Por Alimentos Y PCR: Prevención Y Diagnostico. *Salud Publica de México*; 47(5):388-390.
40. 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):4744-50.
41. Gragg SE, Loneragan GH, Brashears MM, Arthur TM, Bosilevac JM, Kalchayanand N, et al. Cross-sectional study examining *Salmonella enterica* carriage in subiliac lymph nodes of cull and feedlot cattle at harvest. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(4):368-74.

42. Gutierrez CAC, MLH Paasch y ANL Calderón, 2008. Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo, Artículo de Revision. Vet. Méx., 39 (1): 81-90.
43. Hapfelmeier S, K Ehrbar, B Stecher, M Bartel, M Kremer and WD Hardt, 2004. Role of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Effector Proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* Subspecies 1 Serovar Typhimurium Colitis in Streptomycin-Pretreated Mice. Infect Immun; 72(2):795-809.
44. Haneklaus AN, KB Harris, DV Griffin, TS Edrington, LM Lucia and JW Savell, 2012. *Salmonella* Prevalence In Bovine Lymph Nodes Differs Among Feedyards. Journal Of Food Protection; 75(6):1131-1133.
45. Hernández CC, AMG Aguilera y EG Castro, 2011. Situación De Las Enfermedades Gastrointestinales En México. Enf Inf. Microbiol; 31(4):137-151.
46. 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.
47. Holzer K, Weissend C, Huebner K, Metcalf J, Geornaras I, Belk K, et al. Presence and Characteristics of *Salmonella* Enterica Recovered from Subiliac Lymph Nodes of Beef Feedlot Cattle Enrolled in a Randomized Clinical Trial of Dietary Additives. Meat and Muscle Biology. 2017;1(3):131.
48. Jekel JF, Katz DL, Elmore JG. Epidemiology, Biostatistics, and Preventive Medicine. Third ed. Philadelphia, PA, United States of America: SAUNDERS ELSEVIER; 2007. 409 p.

49. Koohmaraie M, Scanga JA, De La Zerda MJ, Koohmaraie B, Tapay L, Beskhlebnaya V, et al. Tracking the Sources of *Salmonella* in Ground Beef Produced from Nonfed Cattle. *J Food Protect.* 2012;75(8):1464-8.
50. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *Journal of clinical microbiology.* 2012;50(4):1355-61.
51. Kunstmann CLJ, 2016. Nódulos linfáticos en animales domésticos. Revisión bibliográfica de su embriología, anatomía e histología. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral e Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Farmacología y Morfofisiología.
52. Lepovetsky BC, HH Weiser and FE Deatherage, 1952. A Microbiological Study of Lymph Nodes, Bone Marrow and Muscle BUSCAR COMO LO CITAN
53. Tissue Obtained from Slaughtered Cattle
54. Li M, Malladi S, Hurd HS, Goldsmith TJ, Brichta-Harhay DM, Loneragan GH. *Salmonella* spp. in lymph nodes of fed and cull cattle: Relative assessment of risk to ground beef. *Food Control.* 2015;50:423-34.
55. MacGowan A and E Macnaughton, 2017 Antibiotic resistance. *Medicine. Prevention and Control of Infection;*45(10):622-628.
56. McDermott PF, Zhao S, Tate H. 2018. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol Spectrum* 6(4):ARBA-0014-2017.  
[doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017)

57. Miranda JM, AC Mondragon, B Martínez, M Guarddon y JA Rodríguez, 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from different raw foods in México. *Journal of Food Protection*; 72(5):966-971.
58. Methner U, N Rammler, K Fehlhaber and U Rösler, 2011. *Salmonella* status of pigs at slaughter — Bacteriological and serological analysis. *International Journal of Food Microbiology* 151 (2011) 15–20
59. Narváez-Bravo C, E Rodas-González, Y Fuenmayor, C Flores-Rondon, G Carruyo, M Moreno, A Perozo-Mena, AE Hoet, 2013. *Salmonella* On Faces, Hides And Carcasses In Beef Slaughter Facilities In Venezuela. *Int. Journal of Food Microbiology*; 166:226-230.
60. Nayarit-Ballesteros N, MS Rubio-Lozano, E Delgado-Suarez, D Méndez-Medina, D Braña-Varela y O Rodas- Suarez, 2016. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella spp* aislados de carne de res molida en la Ciudad de México. *Salud publica de México* ; 58(3):371-377.
61. Nair VTD, K Venkitanayanan and JA Kollanoor, 2018. Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods*; 7, 167.
62. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. 2006. NARMS retail meat annual report. U.S. Food and Drug Administration, Centers for Disease Control and Prevention, and U.S. Department of Agriculture. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM073302.pdf>. Accessed 17 March 2013.

63. NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos, (2014).
64. Novoa-Farías O., AC Frati-Munari, MA Peredo, S Flores-Juárez, O Novoa-García, J Galicia-Tapia y CE Romero-Carpio, 2016. Susceptibilidad De Las Bacterias Aisladas De Infecciones Gastrointestinales Agudas A La Rifaximina Y Otros Agentes Antimicrobianos En México. Revista De Gastroenterología De México; 81(1):3-10.
65. Nickelson KJ, Taylor TM, Griffin DB, Savell JW, Gehring KB, Arnold AN. Assessment of *Salmonella* Prevalence in Lymph Nodes of U.S. and Mexican Cattle Presented for Slaughter in Texas. J Food Prot. 2019;82(2):310-5.
66. Olafson PU, Brown TR, Lohmeyer KH, Harvey RB, Nisbet DJ, Loneragan GH, et al. Assessing Transmission of *Salmonella* to Bovine Peripheral Lymph Nodes upon Horn Fly Feeding. J Food Prot. 2016;79(7):1135-42.
67. OMS, 2017. *Salmonella*, nota descriptiva.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
68. Perez-Montaña JA, AD Gonzalez, J Barra, C Pacheco-Gallardo, AC Campos-Bravo, S García, NL Heredia anf E Cabrera-Diaz, 2012. Frequency And Antimicrobial Resistance Of *Salmonella* Serotypes On Beef Carcasses At Small Abattoirs In Jalisco State, México. Journal Of Food Protection; 75(5): 867-873.
69. Poppe C, N Smart, R Khakhrina, W Johnson, J Spika y J Prescott, 1998. *Salmonella* Typhinurium DT104: A Virulent And Drug-Resistant Pathogen. Can Vet J; 39(9):559-565..

70. Puig PY, HM Espino, CV Leyva, LN Aportela, DM Machín y RP Soto, 2011. Serovariedades Y Patrones De Susceptibilidad A Los Antimicrobianos De Cepas De *Salmonella* Aisladas De Alimentos En Cuba. Rev Panam Salud Publica; 30(6):561-565.
71. 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;6:271-9.
72. Rhoades JR, G Duffy and K Koutsoumanis, 2009. Prevalence And Concentration of Verocytotoxigenic Escherichia Coli, *Salmonella Enterica* And *Listeria Monocytogenes* In The Beef Production chain: A Review. Food Microbiology; 26(357-376).
73. Rivera CLG, DPA motta, UMF Ceron y CFA Chimonja, 2012. Resistencia De La *Salmonella* A Los Antimicrobianos Convencionales Para Su Tratamiento. Rev CES MEd. Vet y zootec; 7(1):116-129.
74. Sisson S y DJ Grossman, 1982. Anatomia de los Animales Domesticos 5ta edición. Tomo I. México, JGH Editores pp. 1135-1153.
75. Tafur JD, JA Torres y MV Villegas, 2008. Mecanismos De Resistencia A Los Antibióticos En Bacterias Gram Negativas. Asociación Colombiana de Infectología; 12(3):217-226.
76. Tizard I, 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. Capítulo 10, Órganos del sistema inmune. 8ª Edición, Elsevier. España. pp:118-123.

77. Varela-Guerrero JA, M Talavera-Rojas, AC Gutierrez-Castillo, NE Reyes-Rodriguez y J Velazquez-Guadarrama, 2012. Phenotypic–genotypic resistance in *Salmonella* spp. Isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of México. Trop Anim Health Prod; 45:995–1000.
78. Weiler N, M Orrego, M Álvarez, C Huber, F Ortiz, L Núñez, L Piris y J Pérez, 2017. Primeros Resultados De La Vigilancia Integrada De La Resistencia Antimicrobiana De Patógenos Transmitidos Por Alimentos, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp En Tres Poblaciones Distintas. Paraguay. 2011-2012. Mem. Inst. Inv. Cienc. Salud; 15(2):64-72.
79. Wray C and A. Wray. *Salmonella* En Los Animales Domésticos. CAB International Wallingford, Oxon, Reino Unido, eds 2000.
80. Yañez E, S Máttar y A Durngo, 2008. Determinación De *Salmonella* Spp Por PCR En Tiempo Real Y Método Convencional En Canales De Bovinos Y En Alimentos De La Vía Pública De Montería, Córdoba. Asociación Colombiana De Infectología; 12(4):247-254.
81. WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization. [citado octubre 2018]. Disponible en:  
[http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodborne-diseases/ferg/en/](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/).
82. Wilhelm BJ, Young I, Cahill S, Desmarchelier P, Nakagawa R, Rajic A. Interventions to reduce non-typhoidal *Salmonella* in pigs during transport to slaughter and lairage: Systematic review, meta-analysis, and research synthesis

- based infection models in support of assessment of effectiveness. *Prev Vet Med.* 2017; 145: 133-44.
83. 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.
84. Zaidi MB, MC Lopez y E Calva, 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev. Latinoamericana de Microbiología.* 48(2):121-125.
85. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vázquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, and Tollefson L, 2008. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging Infectious Diseases*; 14(3):429-435.
86. 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):1685-92.
87. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome research.* 2018;28(9):1395-404.
88. Zankari E, H Hasman, S Cosentino, M Vestegaard, S Rasmussen, O Lund, FM Aarestrup and LM Voldby, 2012. Identification Of Acquired Antimicrobial Resistance Genes. *J Antimicrob Chemother*; 67:2640-2644.