



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**GENÓMICA COMPARATIVA DEL PERFIL DE VIRULENCIA DE
CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* AISLADAS A PARTIR DE
DIVERSAS FUENTES DE ORIGEN BOVINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA:

**ABRIL VIRIDIANA GARCIA MENESES
30905399-2**

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ENRIQUE JESÚS DELGADO SUÁREZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

CÓMITE TUTOR:

**DRA. MARIA SALUD RUBIO LOZANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DRA. SILVIA ANDREA MORENO MENDIETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2021



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.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	IV	
INDICE DE FIGURAS	V	
AGRADECIMIENTOS	VII	
RESUMEN	VIII	
ABSTRACT	IX	
INTRODUCCIÓN	1	
ANTECEDENTES	3	
1	Taxonomía del género <i>Salmonella</i>	3
1.1	Diferencias fenotípicas y genotípicas entre especies, subespecies y serotipos de subsp enterica	5
2	Epidemiología de la salmonelosis	11
2.1	Serotipos especializados contra generalistas	13
2.2	Fenotipos de virulencia en cepas especialistas contra generalistas	15
2.3	Factores genéticos del patógeno y/o hospedero que condicionan las diferencias fenotípicas de adaptación	17
2.4	Epidemiología de la salmonelosis tifoidea	18
2.5	Epidemiología de la salmonelosis no tifoidea	20
2.5.1	Bovinos como reservorios de cepas de <i>Salmonella</i> de importancia clínica	21
3	Patogénesis de la salmonelosis	23
3.1	Adherencia	24
3.2	Invasión	25
3.3	Supervivencia y multiplicación intracelular	29
3.3.1	Genes asociados con fenotipos invasivos e infecciones sistémicas graves	31
3.3.2	Genes asociados con infecciones subclínicas, persistencia en heces o con el establecimiento de portadores	33
4	Islas de patogenicidad (SPI)	34
4.1	Distribución de SPI en el género <i>Salmonella</i>	35

4.2	Funciones de las SPI en el proceso infeccioso y principales genes involucrados	35
METODOLOGÍA		45
1	Recuperación de cepas	45
2	Preparación de bibliotecas y secuenciación de aislamientos	46
3	Evaluación de calidad y depuración de las lecturas crudas	47
4	Ensamblado del genoma	48
5	Predicción del serotipo	51
6	Anotación del genoma	51
7	Identificación del perfil genómico de virulencia	52
8	Análisis comparativos de islas de patogenicidad en <i>Salmonella</i>	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		54
1	Perfil de virulencia de las cepas de <i>Salmonella</i> provenientes de carne molida y linfonodos	54
1	Perfil de virulencia de las 77 cepas provenientes de carne molida y linfonodos	54
1.1	Factores de adhesión	54
1.2	Supervivencia intracelular	56
1.3	Toxinas	57
1.4	Regulación del proceso infeccioso	59
1.5	Captación de hierro	61
1.6	Infecciones asintomáticas	63
1.7	Resistencia al estrés	64
1.8	Plásmido de virulencia	65
1.9	Islas de patogenicidad	66
2	Genómica comparativa de cepas de bovinos y casos clínicos	79
CONCLUSIONES		82
REFERENCIAS		84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía del género <i>Salmonella</i>	3
Cuadro 2. Fórmulas antigénicas de algunas serovariedades de <i>Salmonella enterica</i>	5
Cuadro 3. Frecuencia de <i>Salmonella</i> spp en diferentes fuentes de bovino	22
Cuadro 4. Listado de los datos de las secuencias dentro de la base de datos de NCBI	47
Cuadro 5. Calidad de los genomas ensamblados	49
Cuadro 6. Genes incluidos en el perfil genómico de virulencia	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Islas de patogenicidad 1 y 2 de <i>Salmonella enterica enterica</i> LT2, <i>S. enterica enterica</i> Typhi CT18 y <i>S. bongori</i>	8
Figura 2. Isla de patogenicidad 7 de <i>Salmonella enterica enterica</i> LT2, <i>S. enterica enterica</i> Typhi CT18 y <i>S. bongori</i>	10
Figura 3. Rango de hospederos de diferentes serotipos de <i>Salmonella enterica</i> subs. <i>enterica</i> generalistas y especializados	15
Figura 4. Estructura del SST-3	27
Figura 5. Estructura del SST-4	28
Figura 6. Plásmido de virulencia de <i>Salmonella</i>	32
Figura 7. Contexto genómico de la SPI-1 de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	36
Figura 8. Contexto genómico de la SPI-2 de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	39
Figura 9. Contexto genómico de la SPI-3 de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	40
Figura 10. Contexto genómico de la SPI-4 de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhi str. CT18	41
Figura 11. Contexto genómico de la SPI-5 de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	42
Figura 12. Ejemplo de la comparación de calidad de las secuencias de <i>Salmonella</i> antes y después de la depuración	47
Figura 13. Perfil de virulencia de 77 cepas de <i>Salmonella enterica</i> asociadas con ganado bovino	62
Figura 14. Atlas de BLAST de las SPIs 1-12 de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino	67
Figura 15. Atlas de BLAST de las SPIs 1-3 de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino	71
Figura 16. Atlas de BLAST de las SPIs 4-6 de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino	74
Figura 17. Atlas de BLAST de las SPIs 7-9 de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino	76

Figura 18. Atlas de BLAST de las SPIs 10-12 de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino	78
Figura 19. Matriz de BLAST por tipo de muestra de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino y casos clínicos	79
Figura 20. Matriz de BLAST por serotipo de cepas de <i>S. enterica</i> asociadas con ganado bovino y casos clínicos	81

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por permitirme ser parte del programa de posgrado.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), porque gracias a su financiamiento la realización de este proyecto fue posible.

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), porque sin su apoyo la secuenciación de las cepas no hubiera sido posible.

Agradezco infinitamente al Doctor Enrique Delgado, por compartir conmigo todos sus conocimientos, por la comprensión, la paciencia y la confianza que me brindó durante todo este tiempo. Por creer en mí y tener las palabras adecuadas en todo momento, incluso cuando las cosas se tornaron complicadas.

A las Doctoras María Salud y Silvia Moreno por tomarse el tiempo de enriquecer este trabajo tanto en lo profesional como lo personal. Por su dedicación y precisión en cada una de sus observaciones.

A mi familia, por todo su amor, porque jamás dudaron de mí y cada día siguen acompañándome e impulsándome a ser una mejor persona.

A todos mis amigos y compañeros que de alguna forma su ayuda en diferentes ámbitos del proyecto hizo posible la realización de esta investigación.

RESUMEN

La salmonelosis no tifoidea (SNT) es una enfermedad de gran importancia tanto en salud pública como en sanidad animal. Los casos de SNT en humanos suelen ser consecuencia de una transmisión alimentaria; específicamente, se ha descrito que la carne molida puede contaminarse con *Salmonella* proveniente de nódulos linfáticos de los bovinos debido a la función de filtrado que estos desarrollan, ya que suelen incorporarse con los recortes de carne; esto es posible gracias a que la bacteria es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedero, logrando diseminarse a través del sistema linfático debido a la expresión de diversos genes de virulencia e islas de patogenicidad (SPI) que le permiten a la bacteria permanecer viable en los bovinos sin causar ningún signo de enfermedad. Considerando la importancia de esta bacteria el objetivo de este estudio fue determinar el perfil de virulencia de 77 cepas de *Salmonella* no tifoidea provenientes de bovinos aparentemente sanos previo a la matanza mediante análisis de genómica comparativa en los que se encontró un alto grado de conservación de genes, así como la presencia de elementos genéticos asociados con cepas hipervirulentas, como el plásmido de virulencia. Además, se descargaron 18 genomas de casos clínicos humanos provenientes de las bases de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) y EnteroBase, con la finalidad de determinar la relación existente entre estas cepas y las de bovino. Las cuales presentaron una fuerte relación entre ellas, lo que demuestra que las cepas que se encuentran en los bovinos pueden representar un problema importante de salud pública por la similitud que mostraron en el perfil de virulencia.

PALABRAS CLAVE: *Salmonella*, bovinos, virulencia, genómica

ABSTRACT

Non-typhoid salmonellosis (NTS) is a disease of great importance in both public and animal health. Human NTS cases are usually the consequence of food transmission; specifically, it has been described that ground beef can be contaminated with *Salmonella* from bovine lymph nodes due to their filtering function and because they are usually incorporated in meat trimmings, this is possible because the bacterium can evade the host's immune response, managing to spread through the lymphatic system due to the expression of various virulence genes and pathogenicity islands (SPI) that allow the bacteria to remain viable in cattle without causing any signs of disease. Considering the importance of this bacterium, this study aims to determine the virulence profile of 77 strains of *Salmonella enterica* non-typhoidal from apparently healthy bovines before slaughter through comparative genomic analysis in which a high degree of gene conservation was found, as well as the presence of genetic elements associated with hypervirulent strains, such as the virulence plasmid. In addition, 18 human clinical case genomes were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and EnteroBase databases, to determine the relationship between these strains and the genomes of cattle. Which shows a strong relationship among them; consequently, the strains found in bovines can represent an important public health problem due to the similarity in their virulence profile.

Key Words: *Salmonella*, bovine, virulence, genomics

INTRODUCCIÓN

Cada año aproximadamente 550 millones de personas en el mundo padecen alguna enfermedad transmitida por alimentos (ETA), lo que provoca 230,000 muertes (OMS, 2017). Entre los agentes causales asociados con ETA, *Salmonella* es el de mayor relevancia para la salud pública a escala global (CDC, 2018). Esto se debe a la frecuencia con la que se presenta esta bacteria en diferentes alimentos, especialmente en carne cruda de diferentes especies (CDC, 2018). Particularmente, la carne de res molida se ha identificado como un importante reservorio de *Salmonella*, lo que se ha atribuido a la contaminación de las canales por el contacto con la piel o con las heces del ganado durante los procesos de matanza y faenado (Li et al., 2015; Koochmaraie et al., 2012; Brichta – Harhay et al., 2012). No obstante, se estima que los nódulos linfáticos de los bovinos son una fuente de contaminación de mayor relevancia en carne molida, ya que estos se suelen incorporar con los recortes de carne y grasa en el proceso de molienda (Gragg et al., 2013).

Los nódulos linfáticos funcionan como un mecanismo de filtrado, el cual se encarga de secuestrar bacterias, virus y otros agentes infecciosos para su eventual destrucción. Sin embargo, algunas cepas de *Salmonella* cuentan con mecanismos capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero, logrando diseminarse a través del sistema linfático (Richter-Dahlfors, 1997).

Para el establecimiento exitoso de nichos intracelulares, *Salmonella* requiere expresar diferentes factores de virulencia, tales como los sistemas de secreción, las fimbrias, los flagelos y los transportadores de iones (Salvagni, 2006; Ibarra and Steele-Mortimer, 2009). En algunos casos, estos factores de virulencia provocan graves infecciones sistémicas (Shu-Kee Eng et al., 2015); mientras que en otros sólo se presentan infecciones asintomáticas persistentes (del Bel Belluz et al., 2016). Por lo general, las infecciones sistémicas se asocian con cepas altamente especializadas o restringidas a alguna especie animal (ej. *S. enterica* subespecie

enterica serovar Dublin, Cholerasuis, Gallinarum y Typhi). En contraste, las infecciones asintomáticas son usualmente causadas por cepas generalistas, que se presentan tanto en animales como en humanos.

Por su impacto negativo en la salud, los determinantes genéticos relacionados con la patogenia de la salmonelosis son los que han recibido mayor atención por parte de la comunidad científica. Por el contrario, aún se desconocen los mecanismos involucrados en el establecimiento de infecciones subclínicas. Esta información es de vital importancia para contener la diseminación del patógeno a través de los animales portadores, aparentemente sanos, que se aprueban para la matanza. En la especie bovina, los mecanismos que utiliza *Salmonella* para colonizar y sobrevivir en linfonodos, sin provocar signos clínicos, continúan siendo una incógnita.

Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar las diferencias genéticas asociadas con el establecimiento de infecciones subclínicas en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de carne molida y linfonodos de bovino.

ANTECEDENTES

1 Taxonomía del género *Salmonella*

El género *Salmonella* son bacterias Gram negativas, que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son microorganismos intracelulares facultativos, móviles, catalasa positivos, los cuales son capaces de producir gas a partir de la glucosa, utilizar la lactosa y de reducir nitratos (Wingstrand y Aabo, 2014; Silva y López, 2012; Richter-Dahlfors, 1997).

Se le ha dividido en dos grandes grupos o especies, que son *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (Wingstrand and Aabo, 2014; Lan et al., 2009; Lin-Hui Su y Cheng-Hsun Chiu, 2007; Popoff et al., 2001). *Salmonella enterica* a su vez se divide en 6 subespecies; *enterica* (I), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *indica* (VI) y *salamae* (II); a las que pertenecen más de 2,500 serotipos o serovariedades; mientras que *S. bongori* únicamente está compuesta por 22 serotipos (Cuadro 1) (Barreto et al., 2016; Wingstrand and Aabo, 2014; Gal Mor et al., 2014; Lan et al., 2009).

Cuadro 1. Taxonomía del género *Salmonella* (adaptado de Wingstrand y Aabo, 2014; Grimont, y Weill, 2007).

Género	Especie	Subespecie y número	Número de serovares
<i>Salmonella</i>	<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1531
		<i>salamae</i> (II)	505
	<i>arizonae</i> (IIIa)	99	
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	336	
	<i>houtenae</i> (IV)	73	
	<i>indica</i> (VI)	15	
	<i>S. bongori</i>		22

De las subespecies pertenecientes a *Salmonella enterica*, los serotipos que forman parte de *S. enterica* subsp. *enterica* son las cepas que frecuentemente son aisladas de alimentos de origen animal; mientras que los serotipos del resto de las subespecies de *S. enterica* y de *S. bongori* son aisladas comúnmente de vertebrados de sangre fría; además estos últimos se asocian con enfermedades humanas solo de manera ocasional (Hensel, 2004; Kingsley et al., 2002).

Las serovariedades de *S. enterica* se pueden diferenciar gracias a un sistema que determina la composición antigénica: antígenos somáticos (O), flagelares (H) y de virulencia (Vi). La mayoría de las serovariedades tienen dos genes de flagelina que codifican para las variantes H1 o H2. Este sistema se basa en el esquema propuesto por Kauffman y White; lo que nos permite realizar la serotipificación de las serovariedades gracias a la combinación de estos tres antígenos (O, H y Vi) (OIE, 2018; Langridge et al., 2015; Jurado Jiménez et al., 2010; Lan et al., 2009). Para poder nombrarlos se utilizan diferentes combinaciones de números y letras; primero se muestra una combinación de estos que hacen referencia al antígeno O, los cuales se separan entre sí por comas; seguido de esto se utilizan dos puntos para la identificación de la cápsula (si es que el serotipo cuenta con ella); y por último también separados por comas se colocan los números y/o letras correspondientes al antígeno flagelar. Cuando alguno de los números se muestra entre corchetes significa que este elemento no siempre está presente, mientras que cuando el elemento está ausente se coloca un guion (De la Torre, 2006). En Cuadro 2, podemos apreciar algunos ejemplos de este sistema de clasificación.

Cuadro 2. Fórmulas antigénicas de algunas serovariedades de *Salmonella enterica enterica* (adaptado de Grimont y Weill, 2007)

Serotipo	Antígeno O	Antígeno H		Fórmula antigénica
		Fase 1	Fase 2	
Typhi	9, 12, [Vi]	D	-	9, 12, [Vi]: d: -
Typhimurium	1, 4, [5], 12	I	1, 2	1, 4, [5], 12: i: 1,2
Enteritidis	1, 9, 12	g, m	- ó [1, 7]	1, 9, 12: g, m: - ó 1, 9, 12: g, m: [1, 7]

1.1 Diferencias fenotípicas y genotípicas entre especies, subespecies y serotipos de subsp. *enterica*

Debido a la importancia de la salmonelosis, se han desarrollado diversas investigaciones, las cuales han permitido determinar que *Salmonella* ha sido capaz de evolucionar con la finalidad de adaptarse al medio ambiente (Lan et al., 2009; Lin-Hui Su and Cheng-Hsun Chiu, 2007). Además, se ha demostrado que los serotipos que pertenecen a *S. enterica* comparten aproximadamente entre el 60-75% de su ADN, y a pesar de esta similitud, manifiestan una gran diversidad de fenotipos, lo cual parece estar asociado con el amplio rango de hospederos del patógeno y los signos clínicos que estos manifiestan (Gupta et al., 2019; Barreto et al., 2016; Jacobsen et al., 2011).

Una de las principales características presentes en las dos especies de *Salmonella*, es que ambas tienen la Isla de Patogenicidad 1 (SPI-1) en su genoma. Esta le permite a la bacteria codificar un sistema de secreción de proteínas tipo 3 (SST-3), en donde los operones *prg/org* e *inv/spa* codifican el complejo de la aguja; así como los genes *sip/sic* que se encargan de codificar las proteínas involucradas en la

traslocación de las moléculas efectoras en el citoplasma de las células de su hospedero y sus chaperonas; formando así una estructura de poros en la membrana celular del hospedero y permitiendo la entrada de los efectores al citosol (Figueroa and Verdugo, 2005).

Otro gen importante que se codifica en la SPI-1 es *avr*, ya que le permite a la bacteria inhibir la muerte de las células infectadas, permitiéndole así sobrevivir dentro de las células y diseminarse vía linfática para posteriormente permitir el desarrollo de una enfermedad sistémica (Lan et al., 2009; Lin-Hui Su and Cheng-Hsun Chiu, 2007; Salvagni et al., 2006; Figueroa et al., 2005). También se sabe que el locus hiper invasivo A, mejor conocido como *hilA* (Cardona-Castro et al., 2002), en cepas del serotipo Typhimurium, es necesario para que la bacteria logre una entrada exitosa en las células epiteliales intestinales; lo que se logró determinar en un estudio realizado por Vivek Bajaj et al. (1995), donde crearon tres bacterias mutantes con diferentes deleciones del gen (en una eliminaron 205 aminoácidos, la segunda 19 aminoácidos y la última con deleción completa del gen) y midieron la capacidad de cada una para entrar en células epiteliales, teniendo como resultado una disminución significativa de todas las bacterias en su habilidad para internarse en las células. Además, en este mismo estudio se observó que *hilA* juega un papel fundamental en la expresión de otros genes de invasión; tales como *inv*, *spa*, *ssp* y *org*, ya que cuando no estaba presente en las cepas disminuyó su transcripción, por lo que se cree que si se presenta una sobreexpresión de *hilA* también lo habrá de los demás genes, volviéndose una cepa hiper invasiva.

Otra de las SPI más estudiadas, es la SPI-2, la cual se sabe codifica cuatro tipos de genes importantes de la virulencia para la bacteria (*ssa*, *ssr*, *ssc*, *sse*), los cuales se describirán más adelante. La SPI-2 codifica un segundo SST-3, el cual se expresa cuando la bacteria se encuentra dentro de una vacuola contenedora de *Salmonella*. También se sabe que los 32 genes que forman parte de esta isla le permiten a la bacteria sobrevivir y replicarse en los compartimentos fagocíticos de las células

epiteliales. Además, otra característica esencial de esta isla es que la conforman dos partes: una pequeña, de 14.5 kb, presente en ambas especies de *Salmonella*, así como una región grande, de 25.3 kb, presente solo en *S. enterica*, lo cual es una de las principales características evolutivas y de gran importancia en la diferenciación de ambas especies (Figura 1) (Langridge et al., 2015; Wingstrand and Aabo, 2014; Lan et al., 2009; Lin-Hui Su and Cheng-Hsun Chiu, 2007; Figueroa et al., 2005).

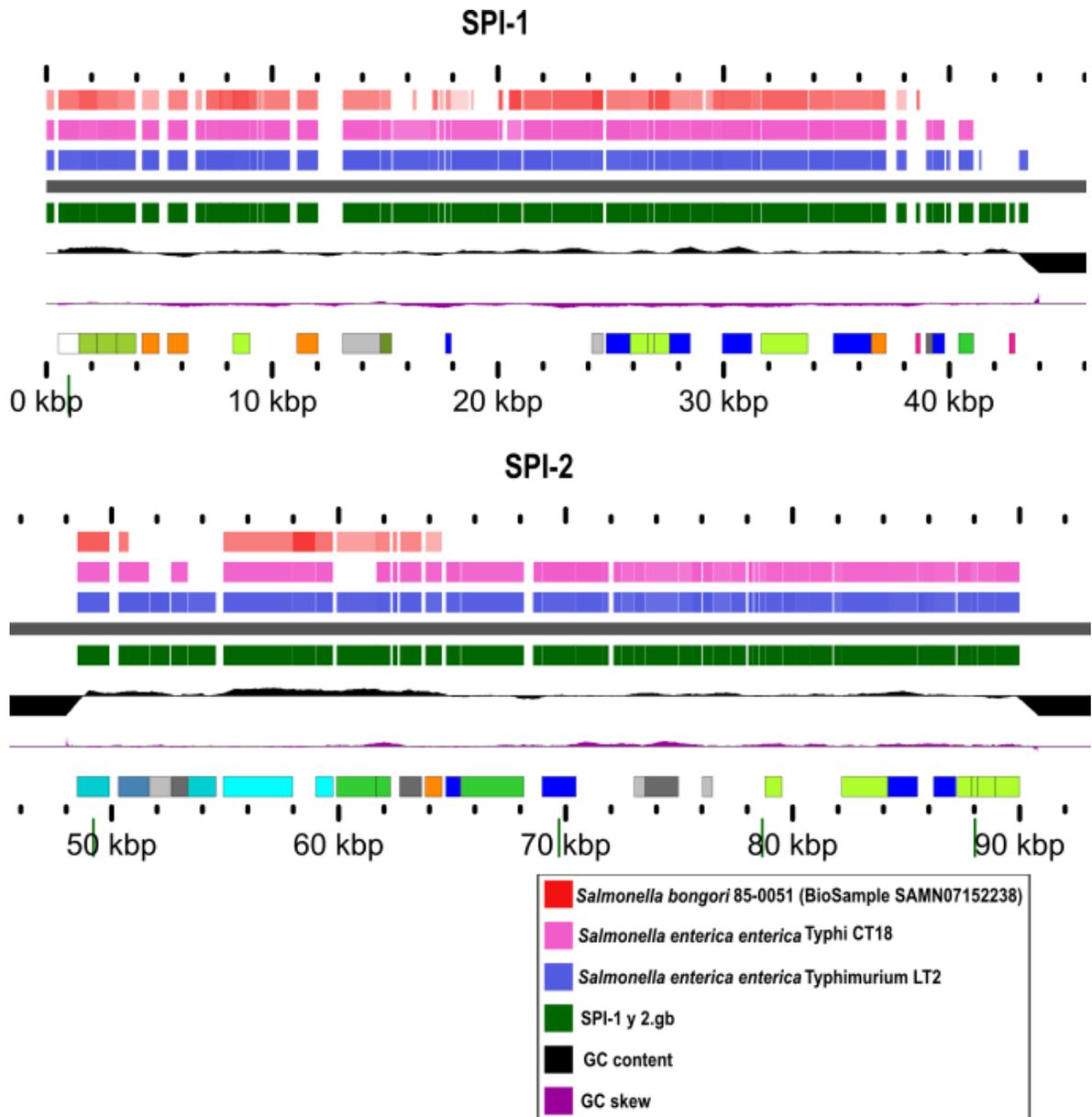


Figura 1. Islas de patogenicidad 1 y 2 de *Salmonella enterica enterica* LT2 (azul), *S. enterica enterica* Typhi CT18 (rosa) y *S. bongori* (rojo), imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016). Se observa la presencia de la SPI-1 en ambas especies de *Salmonella*, mientras que la SPI-2 solo está presente en las especies de *Salmonella enterica*.

Siguiendo con los mecanismos de adherencia, en un estudio realizado en 2019 por Gupta et al., al trabajar con 14 serotipos diferentes de *Salmonella*, encontraron que el operon *lpf* (long polar fimbria) se encontraba en casi todos los serotipos excepto

en *S. enterica* subsp *enterica* serotipos Anatum, Give, Minnesota y Ohio; el cual se ha demostrado juega un papel fundamental en las cepas Typhimurium, ya que participa durante la adhesión del patógeno a las células del intestino delgado en los murinos, confiriéndole a la bacteria la unión a las células de forma hospedero específica (Duffy, Dykes y Fegan, 2012; Bäumlér et al., 1996). Pero a pesar de esto, mantenían el resto de los operones fimbriales, tales como *csg*, *inv*, y *fim*. Otro hallazgo importante que reportaron fue que los operones *pef* (plasmid encoded fimbrial) y *spv*, (plásmido de virulencia) únicamente estaban presentes en *S. enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium. Aunque en otros estudios se ha reportado que el plásmido de virulencia se restringe a serovares asociados con infecciones humanas, más no se limita solo a ellos, ya que se ha encontrado presente en *S. enterica enterica* serotipos Enteritidis, Typhimurium, Gallinarum, Dublin y Cholerasuis (Duffy, Dykes y Fegan, 2012; Biljana et al., 2010; Marcus et al., 2000).

Como se mencionó antes, existen algunos serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, como los tifoideos (Typhi, Paratyphi C) y Dublin (Figuroa and Verdugo, 2005) que presentan cápsula, la cual es codificada en la SPI-7 (Figura 2) (Hensel, 2004). Su principal función es evadir la respuesta inmune del hospedero, esto gracias a que interfiere con el reconocimiento de la bacteria en la mucosa intestinal por los receptores tipo Toll TLR5 (receptor de flagelina) y los receptores TLR4, CD14 y MD2 (que forman el complejo receptor del lipopolisacárido), ya que es capaz de enmascarar a dichos PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) (Raffatellu et al., 2006; Hirose Kenji et al., 1997).

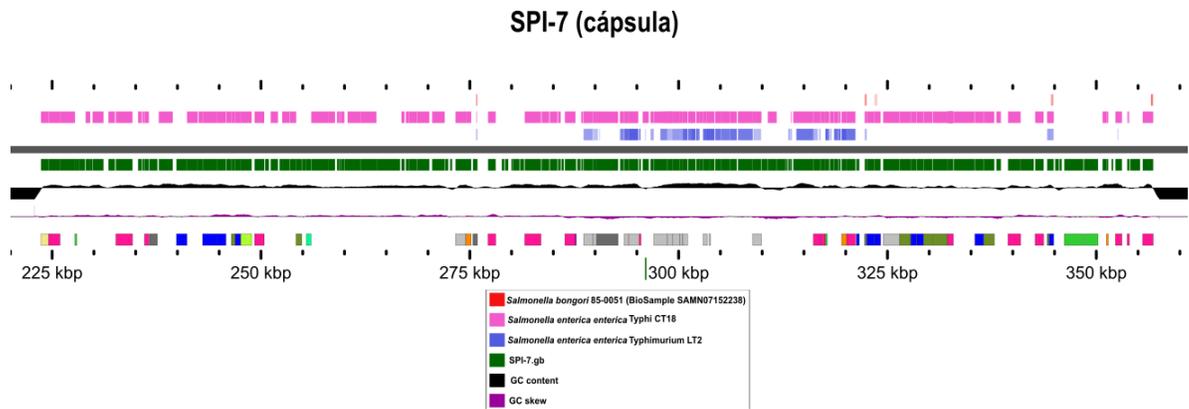


Figura 2. Isla de patogenicidad 7 de *Salmonella enterica enterica* LT2 (azul), *S. enterica enterica* Typhi CT18 (rosa) y *S. bongori* (rojo), imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016). Se observa la presencia de la isla solo en *S. enterica enterica* Typhi CT18.

La bacteria también presenta diferencias en otros mecanismos de acción, como el que caracteriza a los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, ya que presentan el gen *shdA*, el cual únicamente se ha reportado en los serotipos pertenecientes a esta subespecie. Este gen se ha demostrado que es importante para la colonización del ciego en infecciones persistentes en ratones infectados con *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (Kingsley et al. 2002). Este gen junto con el operón *lpf* y al menos otras 19 adhesinas constituye la maquinaria completa de adhesión de este serovar (Hansmeier et al., 2017).

Otro factor de virulencia necesario para la supervivencia intracelular en macrófagos es la SPI-3, ya que le provee a la bacteria los elementos necesarios para su crecimiento bajo condiciones limitadas de magnesio, funciones codificadas en el operón *mgtCB*; el cual está regulado transcripcionalmente por *phoP/phoQ* (Figuroa and Verdugo, 2005). En un estudio realizado por Jacobsen et al. (2011), encontraron que la SPI-3 es diferente en todos los serotipos bajo estudio, ya que todos los aislamientos presentaron variaciones nucleotídicas en diferentes regiones de la isla.

Además de todos los elementos genéticos anteriores algunos serotipos también presentan genes que codifican para enterotoxinas, como *S. enterica* subsp. *enterica*

serovar Typhimurium, *S. enterica* subsp *enterica* serovar Typhi y en algunas ocasiones también en *S. enterica* subsp *enterica* serovar Dublin, que es codificada por el gen *stn*, la cual es similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae* y a la toxina termolábil de *Escherichia coli* (Figuroa and Verdugo, 2005). En otro estudio de secuenciación completa del genoma, se determinó que *S. enterica* subsp *arizonae* y *S. enterica* subsp *diarizonae* tienen en su locus todos los componentes codificantes de la toxina de distensión citoletal (*cdtB*), la cual se ha observado le permite a la bacteria detener el ciclo celular de las células hospederas ya que causa daño a su ADN (Gao et al., 2017; Haghjoo y Galán, 2004).

Todos estos cambios son de vital importancia y se atribuyen en gran medida a la transferencia horizontal de genes por la gran variedad de elementos genéticos de virulencia presentes en las bacterias. Además, la inserción de todos estos elementos y los rearrreglos genómicos tienen un papel fundamental en la habilidad inferida en la bacteria que la hacen capaz de causar desde infecciones asintomáticas hasta enfermedades de carácter sistémico, lo que representa una gran repercusión en la epidemiología de la salmonelosis como una ETA (Langridge et al., 2015).

2 Epidemiología de la salmonelosis

La salmonelosis es una enfermedad de gran importancia tanto en salud pública como en sanidad animal. La causa es un grupo de bacterias altamente ubicuas al cual pertenecen más de 2,500 serovariedades que pueden dividirse en cepas tifoideas y no tifoideas (Barreto et al., 2016; Gal Mor et al., 2014). Se estima que el 86% de los casos de salmonelosis no tifoidea son consecuencia de una transmisión alimentaria, a través de alimentos provenientes de frutas, vegetales, cerdos, pollos y bovinos, los cuales son reservorios de la bacteria (CDC, 2021; Chaudhuri et al., 2013).

Los serotipos de *Salmonella enterica* presentan un amplio rango de hospederos, ya que son capaces de causar enfermedad tanto en animales como en humanos; también se pueden asociar a una especie o a un grupo de especies susceptibles. Esto se debe principalmente a las diferencias presentes en sus factores de colonización e infección (Gupta et al., 2019).

En el caso de la salmonelosis tifoidea es causada por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipos Typhi, Paratyphi A, B, C y Sendai, las cuales únicamente afectan al ser humano (Crump et al., 2019; Fabrega and Vila, 2013). Estos serotipos son capaces de desarrollar una enfermedad sistémica invasiva llamada fiebre entérica o fiebre tifoidea (Fabrega and Vila, 2013).

Aunque la mayoría de los serotipos de *Salmonella* no tifoidea pueden causar enfermedades, principalmente diarreicas, algunas llegan a provocar enfermedades sistémicas, tanto en animales como en humanos. Se ha reportado que algunos animales le sirven a la bacteria como reservorios de manera natural, como los pollos, cerdos y bovinos, los cuales son capaces de transmitir el patógeno al humano, cuando estos consumen alimentos provenientes de animales portadores de la bacteria (Leekitcharoenphon et al., 2016; Wingstrand and Aabo, 2014; Fabrega and Vila., 2013).

En las especies animales que son reservorios de la bacteria, es posible aislarla en heces, linfonodos y cavidad oral. En bovinos se ha reportado una prevalencia de la bacteria muy diversa, ya que se sabe su aislamiento se ve afectado por la zona geográfica y la condición climática en donde se realice el estudio; como lo reportaron Palos et al, (2020), quienes encontraron que Anatum, Reading, Typhimurium y London fueron los serotipos más aislados; o el estudio de Martínez-Chavéz (2015) quien reporto a Typhimurium, Sinstorf, Anatum e Infantis como los serotipos más comunes; y finalmente tenemos a Wingstrand y Aabo (2014) quienes reportaron que

los dos principales serotipos aislados de bovinos son Dublin y Typhimurium, estos últimos son causantes de enfermedades severas tanto en animales como en humanos (Wingstrand and Aabo, 2014).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud los dos serotipos no tifoideos más aislados en casos clínicos humanos son Typhimurium y Enteritidis. Otro factor importante que considerar en el desarrollo de la enfermedad es el estado inmunológico de los pacientes, ya que se sabe que, en personas inmunocomprometidas, con diabetes, niños o personas mayores, la enfermedad suele ser más severa y de carácter invasivo (Shu-Kee Eng et al., 2015; Fabrega and Vila, 2013).

Además de *Salmonella* Typhimurium y Enteritidis, también se ha reportado que los serovares Choleraesuis, Dublin y Heidelberg son otros serotipos relacionados con infecciones graves en humanos, aunque en menor proporción (Lin-Hui Su and Cheng-Hsun Chiu, 2007).

2.1 Serotipos especializados contra generalistas

Dentro de los serotipos existentes de *S. enterica* subsp. *enterica*, existen cepas denominadas especialistas o generalistas, dependiendo del hospedero susceptible (Figura 3) (Langridge et al., 2015). Los serotipos especialistas, se llaman así porque se consideran específicos de un hospedero. Ejemplos de estos son *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi C y Sendai, quienes únicamente infectan a los humanos, por lo que no se diseminan a través de los animales (Wingstrand and Aabo, 2014; Gal-Mor et al., 2014; Lan et al., 2009). Otro ejemplo de serotipos especializados es *Salmonella* Gallinarum-Pullorum, el cual está altamente adaptado a las aves de corral (Langridge et al., 2015; Wingstrand and Aabo, 2014). A este

tipo de serovariedades se les asocia con enfermedades sistémicas y la diarrea puede o no presentarse (Silva and López, 2012).

Otros serotipos considerados también como especialistas son *Salmonella* Choleraesuis la cual está asociada con cerdos y *Salmonella* Dublín que está adaptada al ganado. Estos serotipos, a pesar de considerarse especializados a ciertos hospederos, se han reportado en algunas ocasiones como los causantes de infecciones graves en humanos (Langridge and al., 2015; Wingstrand and Aabo, 2014).

Mientras que las cepas generalistas suelen producir únicamente una enteritis aguda y tienen la capacidad de producir enfermedad en diferentes hospederos (Silva and López, 2012). No obstante, algunos serotipos pertenecientes a este grupo, como Enteritidis, son capaces de infectar a múltiples especies, aunque se presenta con mayor frecuencia en pollos. *Salmonella* Typhimurium es otra serovariedad que es capaz de causar enfermedad en un gran rango de hospederos (Langridge et al., 2015; Wingstrand and Aabo, 2014). Ambos serotipos son considerados de los principales agentes causantes de enfermedad en humanos (Gal Mor et al., 2014; Wingstrand and Aabo, 2014).

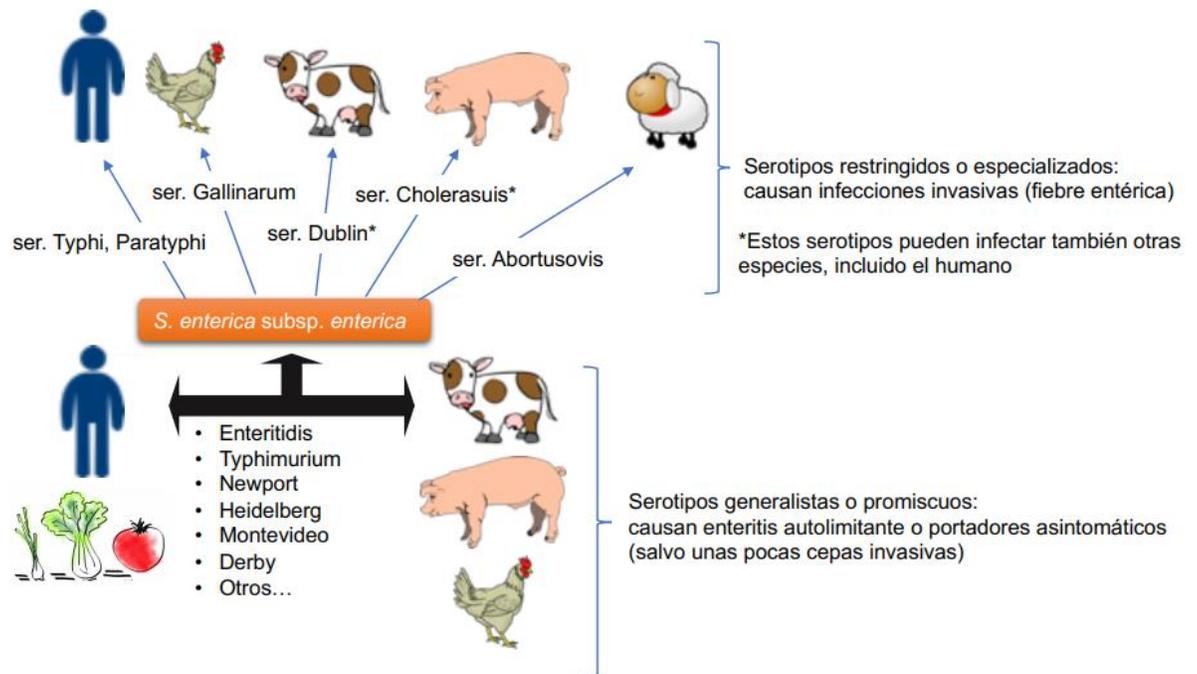


Figura 3. Rango de hospederos de diferentes serotipos de *Salmonella enterica* subs. *enterica* generalistas y especializados (tomada de Delgado, 2019, Tesis de Doctorado).

2.2 Fenotipos de virulencia en cepas especialistas contra generalistas

Debido a la importancia de la salmonelosis su estudio ha sido muy amplio e importante por la comunidad científica. Gracias a esto se ha podido determinar que existe la pérdida y ganancia de genes, los cuales le han permitido a la bacteria adaptarse a sus hospederos (Gupta et al., 2019; Langridge et al., 2015). Las serovariedades especialistas de *Salmonella* usualmente provocan enfermedades invasivas. Esto puede ser a causa de los cambios que estas cepas desarrollaron para poder ser un patógeno altamente apto para un hospedero específico perdiendo la capacidad de infectar a otros (Gupta et al., 2019; Langridge et al., 2015).

Uno de los elementos responsable de la especificidad de los hospederos, es el operon *lpf*, el cual se sabe está implicado en la adhesión de la bacteria en el intestino

delgado. Este operón, en un estudio desarrollado por Gupta et al. (2019), se observó en todos los serotipos estudiados, pero presentaba múltiples diferencias en su secuencia, lo que hace pensar que puede ser un factor importante en la especificidad del hospedero. Otro elemento de adhesión juega un papel crítico en el reconocimiento del hospedero, es el operón *saf*. Gupta et al. (2019) encontraron que su secuencia era diferente en los serotipos provenientes de cerdos portadores asintomáticos, mientras que en los serotipos Choleraesuis y Typhimurium era altamente idéntico (98%).

En 2013 el equipo de Chaudhuri et al., trabajó con aislamientos de *Salmonella* Typhimurium y encontraron que las SPI 1 y 2 son de vital importancia para la bacteria al colonizar el intestino en terneros y cerdos, pero no en pollos. Esto debido a la presencia de los efectores del SST-3 (*sop*, *sip*, *avr*, *sse*, *sif*, *pip*) codificado por estas islas. Otro hallazgo relevante presentado en este estudio fue para el gen *slrP*, el cual se ha demostrado que es de vital importancia durante el desarrollo de la infección en ratones por vía oral, pero no en la infección de los bovinos (Chadiuhuri et al., 2013). En este mismo estudio, se encontró que los genes involucrados en la respuesta al estrés como los del metabolismo de nucleótidos (*pyr*, *pur*, *dgt*, *dcd*, *gua*, *car*), la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (*aro*), el transporte de iones inorgánicos (*trk*, *znu*, *fep*), la síntesis de proteínas (*tuf*, *fus*, *efp*, *rplI*, *rps*), la exportación de proteínas (*tat*, *yaj*) y muchos genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos son importantes para la infección oral del ganado bovino por *Salmonella* Typhimurium. También encontraron que hay genes asociados con la motilidad flagelar (*fliY*, *flgK*, *fliN*, *flgN*, *fliB* y *fliZ*) que son esenciales para la infección de los cerdos, pero no para pollos o terneros. En caso contrario, se requiere de *flgB*, *flgL*, *fliL* para la infección del ganado, pero no para los pollos o cerdos. Mientras que en los pollos, se requieren más genes que participan en el crecimiento anaeróbico, como los involucrados en la producción de la hidrogenasa (*hypOBF*, *hybABCDF*), fumarato reductasa (*frdAD*), reductasa (*nrdDG*) y el regulador *Fnr*.

2.3 Factores genéticos del patógeno y/o hospedero que condicionan las diferencias fenotípicas de adaptación

Se ha descrito que la “adaptación al hospedero” de la bacteria, se dio gracias a la adquisición de las islas de patogenicidad (SPI), por la pérdida de genes y por mutaciones simples que afectan el funcionamiento de otros genes (Langridge et al., 2015).

Uno de los factores relacionados con la adaptación del hospedero es la pérdida o inactivación de las fimbrias. Un claro ejemplo de ello es *Salmonella* Enteritidis, quien alberga 13 operones fimbriales, de los cuales 6 presentan patrones de variación en los linajes. Esta atribución de pérdida de genes ya sea de forma completa o parcial también se ha reportado en serovariedades especialistas o restringidas a un hospedero, tal como *Salmonella* Gallinarum-Pullorum (Landgridge et al., 2015).

Lan et al. (2009) encontraron que *Salmonella* Gallinarum-Pullorum y Enteritidis tienen el mismo antígeno O, siendo el antígeno H quien les confiere la diferencia de hospederos. El operón *fljBA* está ausente en los serotipos Gallinarum y Enteritidis, lo que explica la ausencia de la segunda fase antigénica, mientras que *fliC* está intacto en ambos serotipos. Además, reportaron que existe una delección de 197 bp en *flhB* y una mutación en *flhA*, las cuales son importantes para la flagelina, lo que se cree podría estar involucrado con la especificidad de hospedero de esta serovariedad (Lan et al., 2009).

En cuanto a la mayoría de las cepas tifoideas la expresión flagelar más común es el antígeno codificado por *fliC* en el locus H1; además algunas cepas indonesias tienen un antígeno flagelar adicional, z66, que se describió por primera vez en 1981 (Lan et al., 2009). Otro factor de los más importantes para el desarrollo de la fiebre

tifoidea es su toxina tifoidea, la cual tiene una estructura formada por dos subunidades, PltAB y CdtB, los cuales se unen de forma específica al ácido N-acetilneuraminico-sialoglicano (Neu5Ac), el cual se encuentra de forma predominante en los humanos, favoreciendo su especificidad (Gao et al., 2017).

Por su parte, en los serotipos no tifoideos, se ha demostrado que la SPI-4 de *Salmonella* Typhimurium codifica un SST-1, el cual es importante para la infección de bovinos, pero no para pollos o cerdos (Chaudhuri et al., 2013).

Otra característica importante en los casos de salmonelosis no tifoidea es la capacidad de algunos serotipos para desarrollar bacteriemia, la cual también puede presentarse en cepas tifoideas. Esto gracias a la presencia de *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) en las cepas no tifoideas (Shu-Kee Eng et al., 2015), el cual se ha reportado en pocas cepas de los serotipos Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Enteritidis y Gallinarum. Este plásmido de virulencia está conformado por cinco genes *spvRABCD*, se regula por condiciones ambientales y de crecimiento de la bacteria, además se ha demostrado su importancia en el desarrollo de enteritis graves y enfermedades sistémicas en el ganado (Silva et al., 2017; Chishih Chu et al., 2008; Libby et al., 1997).

2.4 Epidemiología de la salmonelosis tifoidea

La salmonelosis tifoidea (fiebre tifoidea) y paratifoidea son causadas por *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A, B, C y Sendai, respectivamente, las cuales únicamente afectan al ser humano. Debido a esto, la fuente usual de infección es a través de agua o alimento contaminado con heces de personas enfermas (Crump, 2019). El periodo de incubación usualmente es corto, aunque algunos autores reportan que este puede ser hasta de 14 días, incrementando el riesgo de que se presente una infección conforme aumenta la

dosis ingerida (Crump, 2019; Gal-Mor et al., 2014). Los pacientes normalmente presentan fiebres ondulantes de 39 a 40°C, resfriado, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia, náuseas, anorexia, diarrea, dolor de cabeza y tos seca, los cuales normalmente persisten hasta por tres semanas (Gal-Mor et al., 2014).

En el año 2016 se registraron alrededor de 11 millones de casos en el mundo, los cuales pueden clasificarse de acuerdo con su intensidad en baja, media, grave y muy grave, siendo esta última la más reportada. Las complicaciones graves que comúnmente se presentan son perforación intestinal y muerte (Crump, 2019).

La fiebre tifoidea es común en lugares con bajos recursos, lo cual se atribuye a la carente disponibilidad de agua limpia y una inadecuada sanitización de los alimentos, lo que permite que patógenos como *Salmonella* se diseminen por la región con mayor facilidad de forma fecal-oral (Crump, 2019; Gal-Mor et al., 2014). Además, se ha reportado que *S. Typhi*, se presenta de forma diferente de acuerdo con la región; por ejemplo, en Asia este tipo de infecciones es muy común, mientras que en países desarrollados como Estados Unidos o algunas regiones de Europa la enfermedad se presenta solo de forma esporádica y principalmente en personas que viajan a países con altas prevalencias (Crump, 2019).

En México en el año 2020, según la información reportada por la Secretaría de Salud, se presentaron 5,645 casos de fiebre paratifoidea A y 16,858 casos de fiebre tifoidea (SUIVE/DGE/SSA, 2018). Esto nos ubica en una posición intermedia entre los países desarrollados de poca incidencia y los países en desarrollo de alta incidencia.

2.5 Epidemiología de la salmonelosis no tifoidea

Se ha reportado que *Salmonella enterica* es responsable de causar 80 millones de casos de gastroenteritis transmitida por alimentos anualmente en el mundo (Langridge, 2015). Esto debido a la frecuencia con la que es posible encontrar al patógeno en alimentos o agua contaminados, los cuales pueden ser frutas y/o verduras, así como alimentos de origen animal, como huevo, leche y carne de diferentes especies, incluida la de bovino.

En México desde los años 90s, se ha aislado *Salmonella* en un 42.76% a partir de alimentos de origen animal, principalmente de carne de res, cerdo y pollo (Contreras-Soto et al., 2018). En este mismo estudio la segunda fuente de aislamiento de la bacteria fueron los animales, con un 23.42%, de los cuales los bovinos fueron los más significativos con 10%, en comparación con aves de corral y cerdo, los cuales representaron un 5 y 3% respectivamente. Además, se ha encontrado que en el país están presentes al menos 216 serotipos diferentes de *Salmonella enterica*, de los cuales los principales serotipos son Enteritidis, Typhimurium, Agona, Oranienburg, Anatum, y Meleagridis (Contreras-Soto et al., 2018; Gutiérrez-Gogco et al., 2000).

Las *Salmonellas* de serotipos no tifoideos, son las causantes de gastroenteritis en países desarrollados y en desarrollo, tanto en animales como en humanos (Ishmael Festus Jaja, et al., 2019). Los principales síntomas que desarrollan las personas infectadas son gastroenteritis, diarrea acuosa, náuseas, vómito, dolor abdominal y fiebre. Estos suelen aparecer entre 6 a 12 horas después de la ingestión del patógeno y normalmente se resuelven a los 10 días (Gal-Mor et al., 2014).

Aunque normalmente las infecciones causadas por cepas no tifoideas provocan una gastroenteritis autolimitante, está reportado que entre el 5 al 10% de las personas

infectadas desarrollan complicaciones, como bacteremia o meningitis, las cuales pueden llegar a ser fatales (Gal-Mor et al., 2014; Lin-Hui Su y Cheng-Hsun, 2007).

En Estados Unidos en el año 2019, la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) determinó que *Salmonella* fue la responsable de causar el 17% de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos, es decir de los 25,866 casos que se reportaron ese año 8,556 fueron causados por *Salmonella* (este muestreo contempla solo al 15% de la población) (Tack et al., 2020). Los serotipos más comunes fueron Enteritidis, Newport, Typhimurium, Javiana e Infantis.

Durante el año 2020 en México se reportaron 43,944 casos de salmonelosis no tifoidea (SUIVE/DGE/SSA, 2018); donde los estados con mayor incidencia fueron Chiapas y Veracruz con 13,169 y 9,362 casos respectivamente. En 2018, Realpe-Quintero et al., reportaron que los serotipos más frecuentes en heces provenientes de pacientes con diarrea son Typhimurium, Enteritidis y Muenchen; lo que concuerda con otro estudio donde también reportaron que los dos serotipos más frecuentes en este tipo de muestras son Typhimurium y Enteritidis; los cuales también se detectaron en carnes crudas, incluyendo la de bovino (Zaidi et al., 2006).

2.5.1 Bovinos como reservorios de cepas de *Salmonella* de importancia clínica

Debido a la importancia que representa la salmonelosis, se han desarrollado diversos estudios los cuales permiten apreciar la presencia de la bacteria en diferentes fuentes; como canales de bovino (9-18%), heces del ganado (46.8%), linfonodos (52%) y carne de res molida (16-71%). Los serotipos más reportados en estos estudios son consistentes con los obtenidos de pacientes enfermos, siendo los más importantes Typhimurium, Anatum, London, Agona, Infantis y Enteritidis

(Nickelson et al., 2019; Aguilar-Montes et al., 2017; Nayarit Ballesteros et al., 2016; Martínez-Chávez et al., 2015; Cabrera-Díaz et al., 2013; Rubio Lozano et al., 2013; Zaidi et al., 2006).

La frecuencia de contaminación en muestras de origen bovino con serotipos no tifoideos es bastante reportada por diversos investigadores, la cual muestra variación, pero a pesar de esto siempre se encuentran presentes (Cuadro 3). En el Reino Unido se ha reportado que aproximadamente el 12% de los brotes de diarrea están asociados con el ganado, siendo los serotipos Dublin y Typhimurium, los de mayor incidencia, representando el 95% de los casos de salmonelosis (Tsolis et al., 2000).

Cuadro 3. Frecuencia de *Salmonella* spp en diferentes fuentes de bovino

Fuente	País	Año	N	% Positivos	Referencia
Canales de bovino	México	2017	327	3.7	Aguilar et al., 2017
	México	2015	142	18	Martinez-Chavez et al., 2015
	México	2012	505	15.4	Perez-Montaña et al., 2012
Piel	Estados Unidos	2012	100	47	Koohmaraie et al., 2012
	Estados Unidos	2012	100	96	Koohmaraie et al., 2012
Carne Molida	México	2017	238	56.7	Aguilar et al., 2017
	México	2016	100	16	Ballesteros-Nova et al., 2016
	México	2015	65	71	Martinez-Chavez et al., 2015
	México	2013	238	56.7	Cabrera-Diaz et al., 2013
	Estados Unidos	2012	60	1.67	Koohmaraie et al., 2012
Linfonodos	México y EU	2019	400	52	Nickelson et al., 2019
	Estados Unidos	2012	100	18	Koohmaraie et al., 2012

En un estudio realizado por Koochmaraie et al. (2012), se pudo observar la clonalidad existente entre cepas presentes en nódulos linfáticos y carne cruda, lo cual podría corroborar la contaminación de la carne molida debido a los linfonodos; los cuales se sabe no suelen retirarse durante la obtención de la carne molida (Martínez-Chávez et al., 2015; Koochmaraie et al., 2012).

En México el mayor consumo de carne se hace en establecimientos tradicionales pequeños, ubicados en mercados o tianguis sobre ruedas, los cuales pueden tener múltiples fuentes de contaminación (Nayarit Ballesteros et al., 2016; Martínez-Chávez et al., 2015).

3 Patogénesis de la salmonelosis

Para lograr que el proceso infeccioso se lleve a cabo, la bacteria debe ser capaz de desarrollar diferentes etapas, como la adhesión a su célula blanco, invasión de los tejidos, con su posterior replicación y colonización, además de resistir a los mecanismos de defensa de su hospedero y causarle daño (Richter-Dahlfors, 1997).

El proceso infeccioso inicia con la entrada de la bacteria por vía oral, la cual llega al intestino, donde invade a los enterocitos y las células M, al mismo tiempo puede ser fagocitada por macrófagos o células dendríticas, por las cuales logra llevar a cabo su diseminación por los vasos linfáticos y los linfonodos mesentéricos (Silva y López, 2012).

3.1 Adherencia

La adherencia es el primer paso para la presentación de una enfermedad; hace referencia a la habilidad que tiene un patógeno para adherirse a las células del hospedero. *Salmonella enterica* tiene más de 20 adhesinas, las cuales dependiendo de la expresión definen la capacidad de la bacteria de colonizar, invadir e interactuar con elementos de la respuesta inmune del hospedero (Ganji et al., 2019). Existen mecanismos fimbriales como proteínas de adhesión, en *Salmonella* se encuentran las siguientes:

- ✓ Fimbrias delgadas agregativas (*csgABCDEFG*). Permiten a la bacteria adherirse a las vellosidades intestinales, así como unirse a otras células del patógeno para formar biopelículas (Collinson et al., 1996).
- ✓ Fimbrias polares largas (*lpfABCDE*). Le sirven a la bacteria para adherirse a las placas de Peyer, además contribuye en la colonización del ciego y facilitan la excreción en heces de la bacteria (Silva et al., 2012; Baumler et al., 1996).
- ✓ Fimbrias Tipo 1 (*fimACDFHIWYZ*). Le permiten a la bacteria internalizarse de forma independiente del sistema de secreción tipo 3 en las células dendríticas (Althouse C et al., 2003). En *S. Typhimurium* se unen a la laminina (Kingsley et al., 2004).
- ✓ Fimbrias codificadas en plásmidos (*pefABCD*). Le confieren a la bacteria la propiedad de poder unirse a las microvellosidades de los enterocitos, están presentes únicamente en las cepas que portan el plásmido de virulencia (Nde y Logue, 2007; Baumler A.J. et al., 1996).

Este patógeno también cuenta con mecanismos de adhesión afimbriales. Los principales genes que codifican estos factores son:

- ✓ Adhesina de la matriz extracelular (*misL*). Este gen se encuentra en la SPI-3, el cual le permite a la bacteria adherirse a la matriz extracelular y le facilita

la colonización intestinal. En el serotipo Typhimurium, permite la unión a la fibronectina de la superficie celular, confiriéndole la capacidad de tener una mayor invasividad en las células epiteliales humanas (Dorsey et al., 2005; Silva et López, 2012).

- ✓ Adhesinas de la isla de patogenicidad CS54 (*ratB*, *shdA*, *sinH*). Le permiten a la bacteria colonizar el epitelio intestinal y persistir ahí (Kingsley et al., 2003).

Es bien sabido que esta variedad de genes que codifican para adhesinas presentes en *Salmonella* le confiere a la bacteria diferentes mecanismos por los cuales es capaz de adherirse a sus células blanco, lo cual también representa la presencia de genes con redundancia funcional, que podría atribuirse a la gran variedad de hospederos presentes en los diferentes serotipos.

3.2 Invasión

La SPI-1 es de vital importancia en el proceso de invasión, debido a que codifica toda la maquinaria del SST-3, el cual desencadena un sistema de inyección conocido como inyectisoma, disparo o trigger, el cual le permite a la bacteria introducir proteínas efectoras (cuatro en el caso de *Salmonella*) en las células de su hospedero (Barreto et al., 2016; Green and Mecsas, 2016; Hallstrom and McCormick, 2015; Costa et al., 2012; Marcus et al., 2000). Estas proteínas efectoras son los sustratos de este sistema de secreción, los cuales estimulan rearrreglos en el citoesqueleto de las células, facilitando la invasión (internalización) y multiplicación de la bacteria en las células epiteliales (Silva and López, 2012, Steele-Mortimer and al., 2002).

Este SST-3 normalmente presenta chaperonas las cuales guían a los efectores hasta la base del sistema, donde son secretados de forma ATP-dependiente;

presenta tres principales componentes que son el complejo o cuerpo basales, el componente de aguja y el translocon (Green and Meccas, 2016).

El complejo de la base tiene componentes citoplasmáticos y se extiende por la membrana interna y externa, formando una estructura tipo socket, que consiste en varios anillos, formados por PrgK, PrgH e InvG; además de una barra central compuesta por PrgI. Este complejo es muy importante para entrar en contacto con las células del hospedero, la secreción de los efectores (SptP, SipABC, AvrA) y para la inserción del translocon en las membranas de las células del hospedero con la finalidad de inducir cambios en la célula hospedera que permitan el ingreso de la bacteria (Figura 4) (Green and Meccas, 2016; Costa et al., 2015).

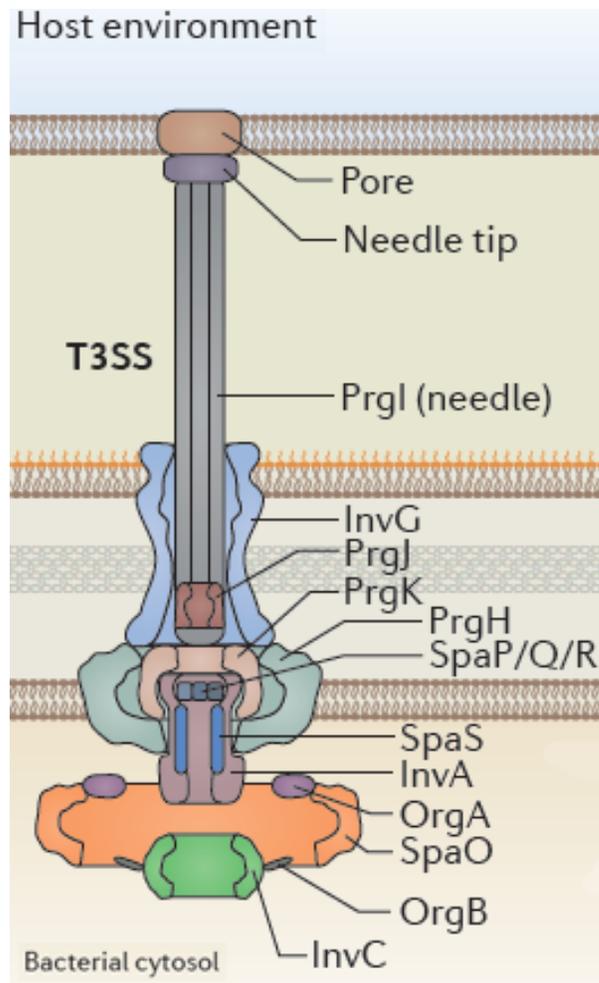


Figura 4. Estructura del SST-3. Compuesto por una ATPasa hexamérica (InvC) y un tipo plataforma (SpaO, OrgAB). InvG se extiende desde la membrana externa bacteriana hasta la base de la membrana interna (PrgKH, SpaPQRS e InvA), formando una serie de anillos protectores que rodean la aguja (PrgI) (tomada de Costa et al., 2015)

Otro mecanismo que la bacteria utiliza para invadir es llamado tipo cierre (zipper-like), donde la proteína Rck es la responsable de adherirse e invadir a las células, esto gracias a que es capaz de formar filamentos de actina que se encuentran rodeando a la bacteria y las cuales le dan la capacidad de internalizarse en la célula del hospedero (Rosselin et al., 2010)

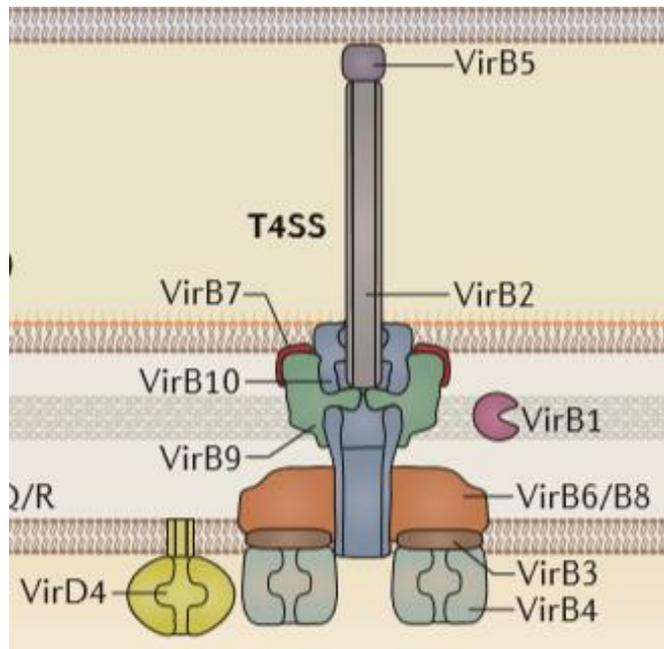


Figura 5. Estructura del SST-4. Está compuesto por 3 ATPasas (VirD4, VirB4 y VirB11) que junto con VirB3, VirB6 y VirB8 forman el complejo de membrana interna. Mientras que VirB7, VirB9 y VirB10 forman el complejo núcleo-membrana externa, y VirB10 se extiende desde la membrana interna hasta la membrana externa (tomada de Costa et al., 2015)

También se ha propuesto que *Salmonella* es capaz de utilizar un SST-4 (Figura 5) para llevar a cabo el proceso de invasión. Este sistema se relaciona principalmente con bacterias intracelulares; presenta una estructura y funcionamiento similar al SST-3 codificado en la SPI-1. Aunque actualmente, aún no ha sido descrito en *Salmonella* en su totalidad. Además, se ha descrito que la fimbria tipo 1, es otro mecanismo que *Salmonella Typhimurium* puede utilizar para mediar la invasión de las células dendríticas de la submucosa intestinal (Costa et al., 2015; Voth et al., 2012; Guo et al., 2007).

Es bien sabido que algunos de estos genes pueden llegar a presentar mutaciones o incluso estar ausentes en las cepas, las cuales causan un impacto principalmente negativo en la capacidad de la bacteria para desarrollar enfermedad. Algunos de estos cambios se han estudiado con mayor profundidad en la SPI-1, debido a la

importancia que representa para la bacteria durante el proceso infeccioso. La presencia de estas mutaciones en los diferentes serotipos de *Salmonella* son posibles, sin embargo no suelen estar presentes de forma “natural” por la pérdida de virulencia que representan para la bacteria. Algunos de estos cambios se abordarán a detalle más adelante.

3.3 Supervivencia y multiplicación intracelular

Una vez superado el proceso de invasión, la bacteria queda contenida en una estructura a la que se le conoce como vacuola contenedora de *Salmonella*, donde la bacteria puede replicarse (Shu-Kee Eng et al., 2015).

Está bien documentado que los macrófagos y neutrófilos son parte importante de la respuesta inmune del hospedero, ya que actúan en contra de microorganismos extraños. *Salmonella* es capaz de sobrevivir intracelularmente en ellos, lo que se considera una característica esencial de virulencia. Además, también promueve la proliferación celular y con la finalidad de asegurar su nicho de proliferación, también se sabe que es capaz de inhibir la unión del fagosoma con el compartimento lisosomal e inducir la apoptosis en las células del hospedero como parte de su proceso infeccioso, una vez que se encuentra lista para diseminarse (Richter-Dahlfors, 1997).

La SPI-2 y SPI-3 son de vital importancia para el crecimiento y supervivencia de la bacteria dentro de las células y también durante las infecciones sistémicas. En el caso de la SPI-2 lo logra gracias a que codifica un segundo SST-3, el cual se activa una vez que la bacteria se encuentra en la vacuola contenedora de *Salmonella* (Barreto et al., 2016). Mientras que la SPI-3 le permite a la bacteria sobrevivir ante condiciones donde el magnesio disponible es limitado (Marcus et al., 2000).

También se ha descrito que existe un segundo SST-3 codificado por la SPI-2, que en el caso particular de *Salmonella* Typhimurium le permite a la bacteria modificar las condiciones del lumen intestinal causando un ambiente a favor de la bacteria, logrando desarrollarse de forma exponencial, mientras que el resto de la microbiota mantiene un desarrollo lento (Silva and López, 2012). Uno de los cambios principales que permite esto, es la capacidad que tiene la bacteria de utilizar el tetrionato como aceptor de electrones, permitiendo esta ventaja de crecimiento (Silva and López, 2012).

Para que la bacteria sea capaz de sobrevivir es necesario que desarrolle diversas técnicas que le permitan cubrir sus requerimientos nutricionales, uno de los principales elementos que necesita es el hierro. *Salmonella* lo adquiere por diversas estrategias mediadas por sideróforos, que funcionan como quelantes de hierro, además de encargarse de su transporte a través de la membrana externa, el periplasma y la membrana citoplasmática. Esto lo logra gracias a que codifica genes tales como *fur*, *iroN*, *fhuA*, *tonB* y *exbB*.

Los genes *tonB* y *exbBD* se sabe forman el complejo TonB, el cual es esencial para transferir energía a la membrana citoplasmática (Ferguson y Deisenhofer, 2002). En donde TonB sirve como un transductor de energía y ExbBD le sirven a este como proteínas estabilizantes, ya que se ha demostrado que la pérdida de alguno de ellos (*exbB* o *exbD*) afectan el desarrollo y actividad de *tonB* (Fischer et al., 1989).

Mientras que *iroN*, *fhuA*, *fepA*, *fhuE* y *foxA* codifican a proteínas receptoras de membrana externa, los cuales se encargan de internalizar el complejo sideróforo-hierro (Ferguson y Deisenhofer, 2002; Rabsch et al., 1999). Por último, pero no menos importante se encuentra *fur*, un gen codificante de la proteína reguladora del hierro, la cual como su nombre lo indica se encarga de regular la expresión de genes involucrados en la síntesis, excreción y adquisición de hierro, así como en el

desarrollo de la respuesta ácido-tolerante (ATR) de *Salmonella* (Hall y Foster, 1996; Visca et al., 1991).

3.3.1 Genes asociados con fenotipos invasivos e infecciones sistémicas graves

Algunas cepas consideradas como fenotipos invasivos han logrado diseminarse ampliamente en diferentes regiones del mundo, tanto en el sector agropecuario como en ambientes hospitalarios. El mejor ejemplo de esto es *Salmonella* Typhimurium DT104, la cual puede catalogarse como una bacteria resistente, virulenta y con alta capacidad de supervivencia. Esto debido en gran parte a su capacidad de resistencia a múltiples antibióticos, como ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas (Cornelius Poppe et al., 1998).

Aunado a esto, existen aislamientos denominados como clonas de alto riesgo (*high-risk-clones*), los cuales al igual que las cepas invasivas se han encontrado en todo el mundo, tanto en animales como en humanos, los cuales también presentan genotipos resistentes a diversos antibióticos y que portan factores de virulencia. Una forma de explicar la aparición de estas bacterias es por la selección de plásmidos de virulencia y resistencia.

En el caso particular de *Salmonella* existe un plásmido de virulencia, el cual se ha reportado que está involucrado con infecciones entéricas graves y sistémicas de terneros (Libby et al., 1997). Este plásmido está formado por más de 100 genes (Figura 6), de los cuales tres son los más importantes; los genes *spvRABCD*, donde *spvR* funciona como su regulador transcripcional, *spvA* es su regulador negativo y *spvBCD* son las proteínas asociadas a la membrana. El tamaño de *spv* varía dependiendo del serovar en el que se encuentre por ejemplo, en el serovar Typhimurium tiene un tamaño de 95kb mientras que en Enteritidis el tamaño es

Otros factores importantes de virulencia reportados en *Salmonella* son los genes *phoPQ*, los cuales se ha demostrado que son de naturaleza conservada con diferentes funciones reguladoras, como la resistencia de péptidos antimicrobianos catiónicos que mejoran la función de barrera de membrana externa, la supervivencia intracelular y la capacidad de causar enfermedades invasivas y sistémicas (Gupta et al., 2019).

Mientras que en los serotipos Typhimurium y Dublin se ha reportado que cuando portan el gen *ST313-td*, estos suelen ser muy invasivos para los humanos (Kariuki et al., 2015). Este gen se encuentra en una isla genómica del mismo nombre, la cual mide aproximadamente 18kb. En un estudio realizado por Herrero-Fresno et al. (2014), lograron determinar que este gen juega un papel importante durante enfermedades sistémicas, ya que observaron que las cepas que no tenían este gen eran menos virulentas en ratones, ya que la capacidad de las bacterias para internalizarse y sobrevivir dentro de los macrófagos disminuía significativamente. Además, se observó mayor prevalencia en cepas provenientes de muestras sanguíneas que de otras fuentes, incluyendo alimentos.

A pesar de que la bacteria presenta múltiples factores de virulencia que le permiten considerarse muy invasiva, existen ocasiones en las que es capaz de desarrollar infecciones subclínicas, un aspecto de gran relevancia que determina el carácter de *Salmonella* como patógeno transmitido por alimentos.

3.3.2 Genes asociados con infecciones subclínicas, persistencia en heces o con el establecimiento de portadores

Para que *Salmonella* sea capaz de mantenerse persistente es necesario que evada al sistema inmune del hospedero para lograr establecerse en un nicho. La forma

principal para lograrlo es haciendo uso de estrategias de variación antigénica y anti-defensa (Blaser and Kirschner, 2007).

Una de sus principales herramientas para lograr la persistencia, es gracias a la presencia de sus seis operones fimbriales (*lpf*, *bcf*, *stb stc*, *std* y *sth*), los cuales se ha demostrado le facilitan a la bacteria la colonización del ciego y su excreción en las heces en modelos experimentales 30 días post-infección (Silva y López, 2012).

Otro factor fimbrial que se ha demostrado favorece la persistencia intestinal de la bacteria en animales clínicamente sanos y que además le permite continuar excretándose en las heces es *shdA*, que es de vital importancia en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ya que le permite a la bacteria adherirse a la matriz extracelular (fibronectina y colágeno) de las células de su hospedero, lo que se cree es una forma de favorecer la contaminación de las canales, instalaciones e instrumentos de procesamiento de alimentos con la bacteria. Además, solo se encuentra presente en los serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* (Silva and López, 2012; Kingsley et al., 2002).

Dentro de la SPI-3, se encuentra el gen *misL*, el cual también se ha asociado a la colonización intestinal crónica en modelo murino y aves. En modelos *in vitro*, se ha observado su unión con la fibronectina, causando agregados bacterianos, los cuales se cree son lo que contribuyen a la colonización bacteriana persistente (Naughton et al., 2001; Silva and López, 2012).

4 Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (SPI) son regiones de genes concentrados en el ADN de las bacterias, los cuales desarrollan funciones de virulencia. Son consideradas elementos importantes en la evolución de las bacterias patógenas ya que

normalmente están ausentes en las cepas no virulentas (Barreto et al., 2016; Marcus et al., 2000).

Existen tres características que las regiones de genes deben presentar para poder considerarse una SPI; las cuales son: presentar un porcentaje de GC diferente al promedio del resto del genoma bacteriano, el cual generalmente es inferior; deben estar cercanos a genes de ARNt y normalmente están delimitadas por secuencias repetidas de nucleótidos (Barreto et al., 2016). Estas características indican que su probable adquisición fue mediante transferencia horizontal de genes a partir de fagos o plásmidos de origen desconocido (Barreto et al., 2016; Marcus et al., 2000).

4.1 Distribución de SPI en el género *Salmonella*

En *Salmonella* se han descrito más de 20 SPI, de las cuales las primeras cinco son las más estudiadas (Figuroa and Verdugo, 2005). Esto se debe a que son las únicas presentes en todos los serotipos de la especie, brindándole a la bacteria mecanismos comunes que participan y son importantes en el proceso infeccioso (Barreto et al., 2016).

4.2 Funciones de las SPI en el proceso infeccioso y principales genes involucrados

La SPI-1 y SPI-2 son de vital importancia para el éxito de la infección, ya que le facilitan a la bacteria la invasión de las células epiteliales y su supervivencia dentro de los macrófagos, respectivamente (Barreto et al., 2016, Hallstrom and McCormick, 2015; Marcus et al., 2000). Ambas islas, son las responsables de la codificación de dos sistemas de secreción tipo 3 diferentes y de proteínas efectoras (Barreto et al., 2016; Hallstrom and McCormick, 2015; Marcus et al., 2000).

Los SSTT son estructuras similares a una jeringa, las cuales secretan ciertas proteínas efectoras en las células humanas o animales permitiéndole a la bacteria invadirlas (Barreto et al., 2016). Específicamente el SST-3 es usado por los patógenos para liberar factores de virulencia los cuales son capaces de interferir o modificar la señalización normal de las células del hospedero (Marcus et al., 2000).

La SPI-1 (Figura 7) está presente en todas las serovariedades de *Salmonella*, tanto *S. enterica* como *S. bongori*. Es un segmento de 35-40kb, con un porcentaje de G-C de 42-47%, está flanqueada por los genes *fhIA* y *mutS* y contiene 31 genes, los cuales pueden dividirse en 3 grupos: los genes que forman parte del SST-3 (*inv*, *spa*), los genes de proteínas efectoras (*SptP*, *SipABC*, *AvrA*) y por último los genes de las proteínas chaperonas. Como se mencionó anteriormente su principal función es producir el SST-3 el cual juega un papel fundamental en la invasión de la bacteria.

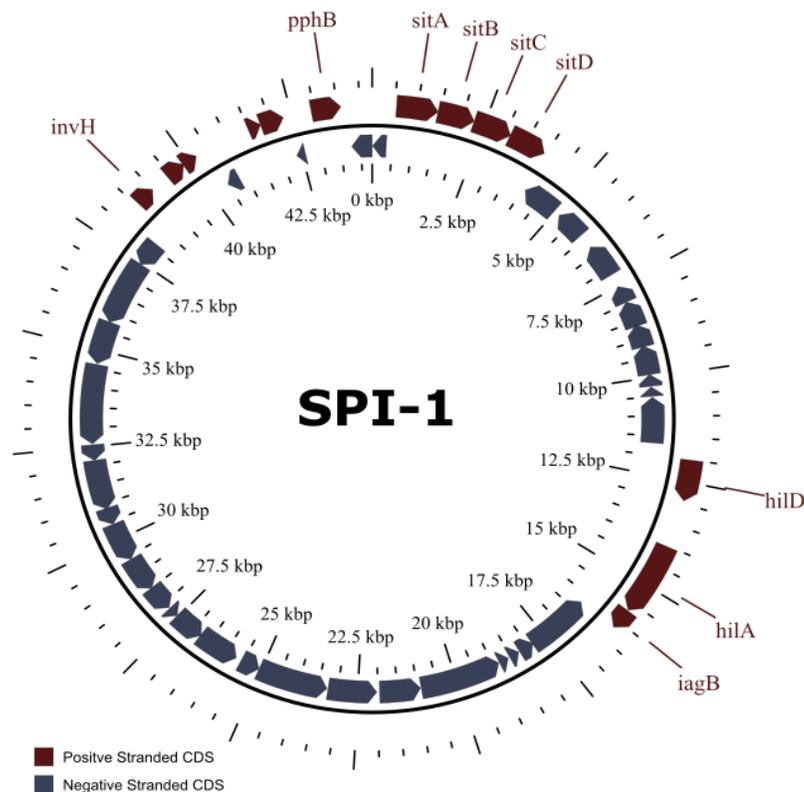


Figura 7. Contexto genómico de la SPI-1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

La proteína efectora SptP (*Salmonella* protein tyrosine phosphatasa) induce modificaciones en el citoesqueleto de las células hospederas al ser inyectado en estas mediante un efecto denominado “*ruffling*”, lo cual favorece la invasión de las células no fagocíticas (Barreto et al., 2016; Hallstrom and McCormick, 2015; Marcus et al., 2000). SipA es otra proteína efectora, la cual se une directamente a la actina de la célula hospedera inhibiendo su despolimerización logrando estabilizar los filamentos de actina. SipB es la proteína efectora encargada de unirse a la proteasa proapoptótica caspasa-1 para inducir la apoptosis de la célula hospedera, esto en las primeras etapas de la infección. La función de la proteína SopE también es inducir rearrreglos en el citoesqueleto de la célula hospedera, esto al activar Cdc42 y Rac (GTPasas).

Además, la SPI-1 participa en la replicación intracelular e interviene con la respuesta inmune del hospedero (Barreto et al., 2016; Figueroa and Verdugo, 2005). La replicación de la bacteria se logra gracias a SopB y SptP, ya que evitan la fusión de la vacuola contenedora de *Salmonella* (SCV) y el lisosoma, esto al modificar las cargas negativas en las membranas. Una vez que la SCV se encuentra en la región perinuclear, entonces *Salmonella* comienza su proliferación. Mientras que para la evasión de la respuesta inmune del hospedero, una de las formas que emplea es la activación de Akt mediada por SopB que le permite a la bacteria sobrevivir. Otro de los mecanismos implicados necesitan la expresión de *avrA*, ya que se ha visto que suprime la inflamación intestinal y con esto la liberación de algunas citocinas que ser importantes en infecciones crónicas.

Se ha demostrado que la presencia de mutaciones en esta SPI-1; por ejemplo, en el gen *invA*, da como resultado una disminución de la virulencia de la bacteria cuando esta entra por vía oral. También se ha reportado que las cepas mutantes que carecen de SptP presentan una limitada capacidad para colonizar el bazo en

ratones (Marcus et al., 2000). Mientras que en bovinos, la presencia de mutaciones en este gen (*sptP*) o en *phoN*, al infectarlos vía oral no representan ningún cambio en la habilidad de las cepas Typhimurium para colonizar el tejido intestinal. También se ha reportado que la presencia de mutaciones en *prgH*, *hilA* e *invH*, traen como resultado una atenuación de *Salmonella* Typhimurium en infecciones orales en el ganado (Tsolis et al., 2000).

En cuanto a la SPI-2 (Figura 8) es responsable de codificar alrededor de 32 genes, los cuales codifican otro SST-3 y un sistema regulatorio de dos componentes. Su función principal es regular la replicación y supervivencia de la bacteria en las células epiteliales y fagocíticas, siendo un mecanismo importante para lograr una infección sistémica. Su activación se inicia cuando la bacteria se encuentra en las vacuolas contenedoras de *Salmonella*. Tiene un porcentaje de G-C de 44.6% y mide aproximadamente 40kb (Barreto et al., 2016; Figueroa and Verdugo, 2005).

La SPI-2 se divide en dos segmentos; la región pequeña (14.5kb) que alberga 5 genes *ttr* involucrados en la reducción del tetratoato y siete marcos abiertos de lectura (ORF, siglas inglesas de Open Read Frames) de función desconocida los cuales no parecen tener actividad significativa durante infecciones sistémicas. Por su parte, la región grande (25.3kb) codifica genes de virulencia los cuales pueden agruparse en cuatro operones principales. Los primeros son los genes *ssa*, los cuales le permiten a la bacteria codificar un SST-3 (diferente al codificado por la SPI-1); los genes *ssr* que son los responsables de codificar sus reguladores; *ssc* que codifican las chaperonas; y por último los genes *sse* que codifican los efectores. Además, se ha visto que las bacterias con mutaciones en esta isla son incapaces de diseminarse hacia los linfonodos mesentéricos, hígado y bazo (Figueroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000). Mientras que el sistema regulador de dos componentes es necesario para la expresión de genes del SST-3, que está compuesto por SsrA que es una proteína presente en la membrana y sirve como sensor; y SsrB que es un regulador transcripcional (Marcus et al., 2000).

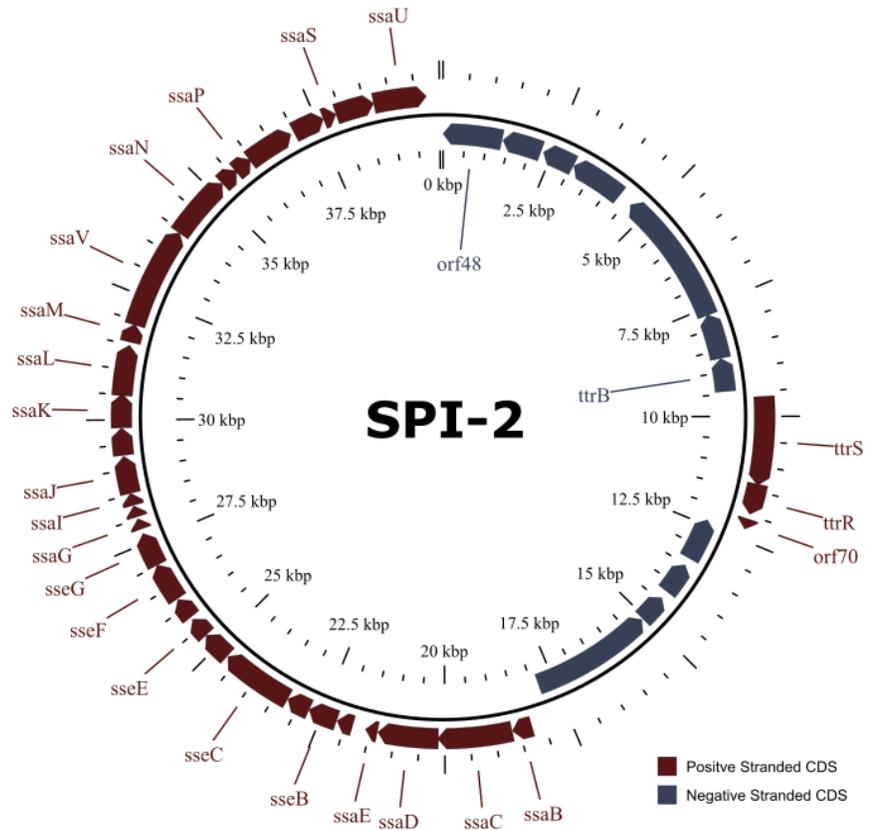


Figura 8. Contexto genómico SPI-2 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

La SPI-3 (Figura 9) es necesaria para la supervivencia intracelular en los macrófagos, ya que provee productos esenciales para el crecimiento de la bacteria en condiciones limitadas de magnesio. Se encuentra en el centisoma 82, presenta un porcentaje de G-C de 39.8-49.3 y puede decirse que es una isla pequeña ya que mide 17kb. Está regulado por *phoPQ* y presenta diez ORF organizados en seis unidades transcripcionales, los cuales incluyen el operon *mgtCB*. Otras dos proteínas codificadas en esta isla que son importantes en las infecciones crónicas y la especificidad del hospedero son MarT y MisL (Figuroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000).

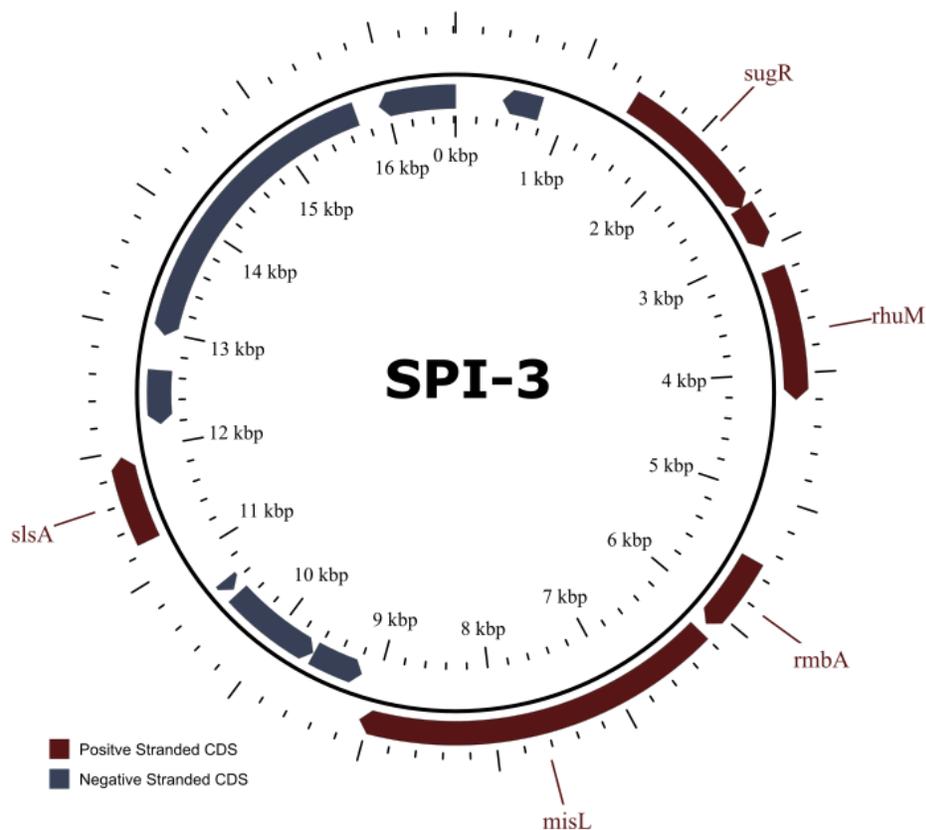


Figura 9. Contexto genómico SPI-3 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

En cuanto a la SPI-4 (Figura 10), esta codifica un SST-1 y participa en la adaptación al ambiente intracelular en los macrófagos, además de mediar la secreción de toxinas. Tiene un tamaño de 27 kb donde alberga 18 genes (Figueroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000). En un estudio realizado por Tünde Kiss et al. (2007), demostraron que cuando la bacteria no tiene la región codificante de la SPI-4 ésta pierde capacidad de causar enfermedad sistémica en comparación con una cepa que, sí presenta la isla, aunque únicamente en infección oral en ratones. También se sabe que esta isla contiene 6 ORFs, organizados en un operón llamado infección intestinal por *Salmonella* o *siiABCDEF*, el cual participa durante la fase inicial de la infección en el epitelio intestinal y favorece la persistencia de la bacteria (Fabrega and Vila, 2013; Tünde Kiss et al., 2007). En el 2007 el equipo de Morgan Eirwen et

al., crearon una serie de mutaciones en este operón con la finalidad de establecer la función de cada gen en la bacteria, con lo que pudieron determinar que al estar presentes mutaciones en los genes *siiD*, *siiE* y *siiF*, las bacterias se vuelven deficientes en la colonización del epitelio intestinal del ganado; estudio donde también encontraron que es posible que esté presente el gen mas no la proteína SiiE en cepas que presentan una mutación en los genes *siiC*, *siiD* y *siiF*.

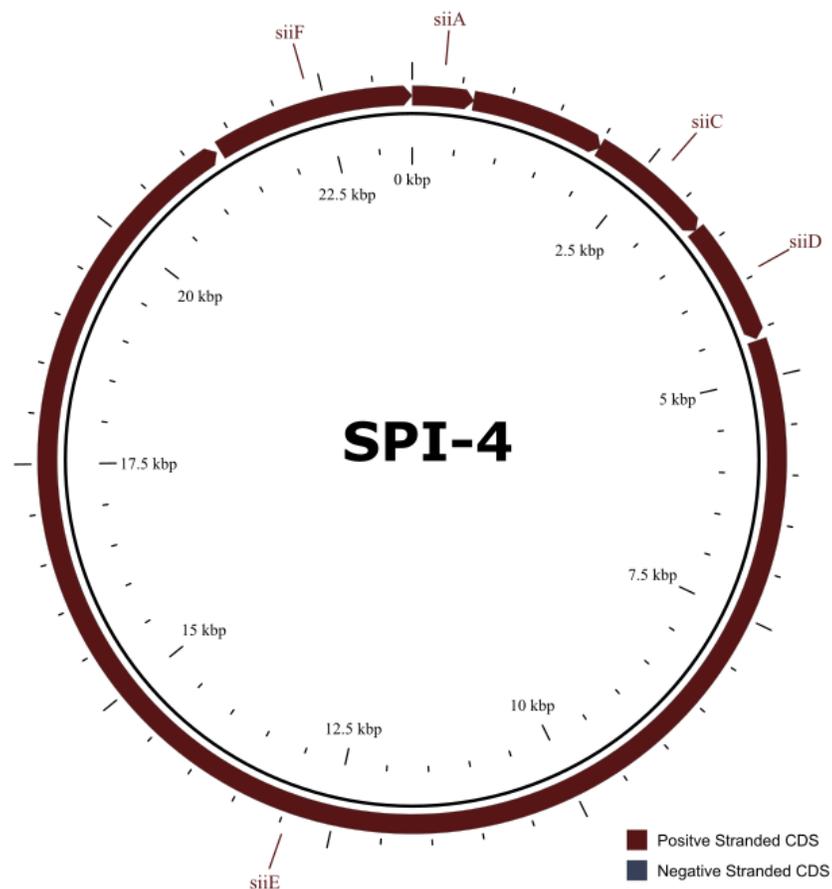


Figura 10. Contexto genómico SPI-4 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi CT18, imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

La SPI-5 (Figura 11) alberga factores de virulencia, los cuales son importantes en la inflamación y la secreción clorhídrica, característica de la fase enterica de la enfermedad (Marcus et al., 2000). Esta isla mide 7.5 kb; tiene un porcentaje de CG de 43.6% y esta co-regulado por el SST-3 de la SPI-1 y SPI-2 (Karasova et al., 2010;

Figuroa and Verdugo, 2005). Se ha demostrado que cuando existen mutaciones en *pipD* (pathogenicity island encoded protein), *sopB* (*Salmonella* outer protein), *pipB* o *pipA* se presenta una respuesta secretora atenuada en los bovinos (Marcus et al., 2000).

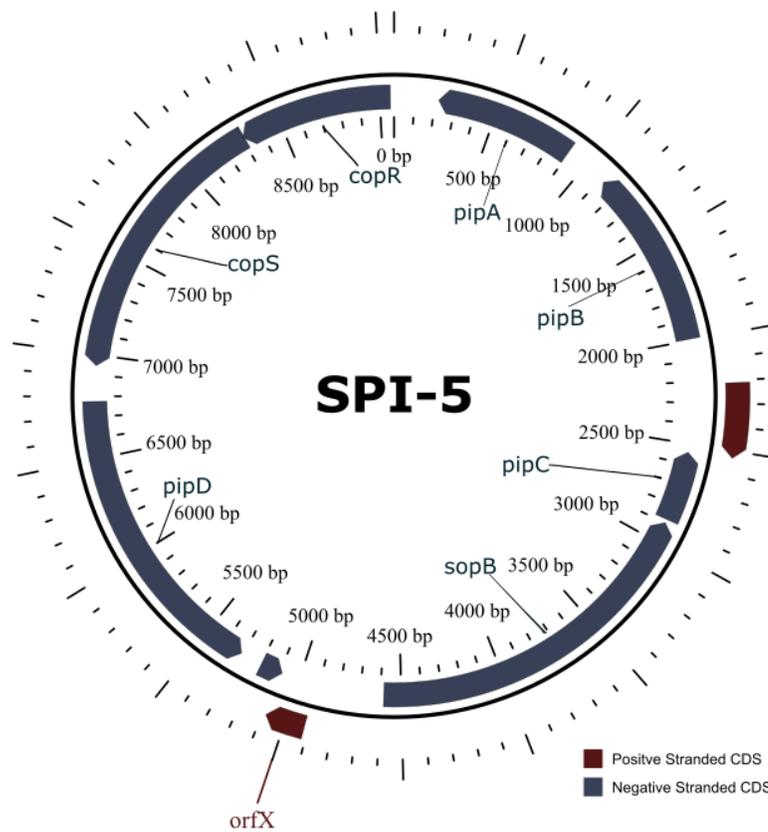


Figura 11. Contexto genómico SPI-5 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2, imagen generada en el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

El resto de las islas, 6 a la 12, se encuentran mejor caracterizadas en cepas tifoideas; sin embargo, su presencia en cepas no tifoideas también esta reportada aunque en algunas de ellas no se sabe su función específica.

La SPI-6 codifica un SST-6, el cual se activa durante la fase tardía en la invasión de los macrófagos y células epiteliales por la bacteria (Brunet et al., 2015). Esta isla se

encuentra en el centisoma 7 de *Salmonella*, tiene un tamaño de 59 kb y además de los genes del SST-6, también se encarga de la codificación del operón de la fimbria *safA-D* y *tcsA-R* (Langridge et al., 2015; Sabbagh et al., 2010). En *Salmonella* Typhi se ha demostrado que la eliminación de esta isla afecta la capacidad de invasión y virulencia de la bacteria en ratones por infección intraperitoneal (Chaudhuri et al., 2013); así como también en *S. Typhimurium* la capacidad de invasión de la bacteria disminuye en células Hep2 al no estar presente esta isla, sin embargo, no presentó cambios en experimentos *in vivo* desarrollados en ratones (Folkesson et al., 2002).

La SPI-7 tiene un tamaño de 134 kb y codifica la síntesis de la cápsula (antígeno Vi) y *sopE*. Como se mencionó anteriormente, los genes codificantes de la cápsula solo se encuentran presentes en los serotipos tifoideos (Typhi y Paratyphi C) y Dublin la cual les permite evadir la respuesta inmune del hospedero, por lo cual esta isla ha sido mayormente reportada en estos serotipos (Pickard et al., 2003).

Dos de las islas menos estudiadas son la SPI-8 y 9. De la primera, se sabe que mide entre 6 a 8 kb aproximadamente y presenta dos pseudogenes que codifican bacteriocinas y una integrasa. Mientras que la SPI-9 mide 16kb y presenta genes codificantes para un SST-1 y proteínas tipo RTX (Sabbagh et al., 2010; Figueroa y Verdugo, 2005).

En cuanto a la SPI-10 se sabe tiene un tamaño de 33 kb y está ubicada en el centisoma 93, aunque estas características son más comunes en *S. Typhi* ya que en *S. Typhimurium* se reporta con un tamaño menor que corresponde únicamente a 20kb. De esta isla al igual que las dos anteriores no hay mucha información respecto al funcionamiento ni composición pero se sabe que aquí se codifica un operón fimbrial (*sefABCDR*) (Sabbagh et al., 2010; Figueroa y Verdugo, 2005).

La SPI-11 se identificó por primera vez en el serotipo Cholerasuis, en donde presenta un tamaño de 14kb mientras que en el serotipo Typhimurium su tamaño

es menor, ya que solo cuenta con 6.7kb. En esta isla se encuentran genes involucrados en la supervivencia intramacrófago, *pagDC* y *phoP* (Sabbagh et al., 2010). Por último, la SPI-12 se localiza en el centisoma 48 con un tamaño de 15.8kb en el serotipo Typhimurium y únicamente 6.3kb en *S. Typhi*; se sabe que contiene 11 ORFs, que incluyen genes asociados a fagos, como *oafA* (Sabbagh et al., 2010).

METODOLOGIA

En este estudio se analizaron 96 cepas de *Salmonella* provenientes de muestras de carne molida sin grasa (11), carne molida con grasa (17), linfonodos superficiales (39), linfonodos profundos (10) y casos clínicos humanos (19) empleando técnicas de genómica comparativa, para determinar si existen diferencias en el contenido de genes de virulencia presentes en estas cepas.

1 Recuperación de cepas

Se utilizaron 77 cepas provenientes de un estudio previo perteneciente a un proyecto de maestría, desarrollado durante los años 2016-2018 (Palós, 2021). Estos aislamientos se obtuvieron de muestras provenientes de un centro de distribución y venta de carne, localizado al norte de la Ciudad de México. Las canales de bovino que llegan a este centro provienen de una empresa integrada en sus operaciones de engorda y matanza que está localizada en el estado de Veracruz. Los animales que se matan son machos jóvenes (entre 20 y 25 meses) de una cruce de *Bos indicus*. De cada canal se obtuvieron linfonodos superficiales (cervical y subilíaco), linfonodos profundos (axilar propio y celíaco), carne magra y recortes de grasa circundante a los mismos linfonodos y se sometieron a procedimientos de detección y aislamiento de *Salmonella* spp de acuerdo con los lineamientos establecidos en la NOM-210-SSA-2014, con algunas modificaciones (<https://www.protocols.io/view/salmonella-spp-detection-and-isolation-bpybmpsn>).

Todos los aislamientos se confirmaron por pruebas bioquímicas convencionales (triple azúcar hierro; ácido sulfhídrico, indol, motilidad; citrato de Simmons, urea y lisina hierro agar) (NOM-210-SSA1-2014) y reacción en cadena de la polimerasa, amplificando un fragmento de 284 pb del gen *invA* (Rahn et al., 1992). Los aislamientos puros se preservaron en viales a -80°C en una solución de caldo

infusión cerebro corazón (BHI) y glicerol al 10%. Posteriormente la bacteria fue recuperada utilizando medio de cultivo TSA y XLD para la extracción de ADN, con el kit comercial de Roche, High Pure PCR Template Preparation. Mientras que las 19 secuencias provenientes de casos clínicos humanos se obtuvieron de la base de datos del NCBI y Enterobase (Zhou, et al., 2020). Estos se eligieron tomando en cuenta lo siguiente: proveniente de casos clínicos humanos, correspondientes a los mismos serotipos encontrados en las muestras provenientes de bovinos, con el menor número de contigs posible y provenientes en primera instancia de México, de no ser posible de países con una cercanía a este, tal como Estados Unidos y Canadá.

2 Preparación de bibliotecas y secuenciación de aislamientos

Una vez obtenido el ADN de los aislamientos, se verificó su pureza e integridad mediante espectrofotometría de micro volumen utilizando un equipo NanoDrop ONE (Thermoscientific, Madison, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para lograrlo, se verificó que la relación de absorbancia se encontrara entre 260/230 y 260/280 UA, y también que la cantidad presente de ADN en cada una de las muestras fuera superior a 1ng/μL. Las muestras que cumplieron con las características anteriormente señaladas se pasaron al proceso de preparación de bibliotecas para la secuenciación, también llamadas genotecas.

Para la secuenciación, se utilizó un sistema MiSeq de Illumina y, para la preparación de bibliotecas se usó el kit Nextera XT versión 3 con un inserto de 150pb y una profundidad mínima estimada de 30x, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3 Evaluación de calidad y depuración de las lecturas crudas

Una vez obtenidas las lecturas crudas de la secuenciación, estas se sometieron a un proceso de evaluación de calidad utilizando el programa FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, las lecturas crudas se depuraron para eliminar los adaptadores de secuenciación de Illumina, así como las bases de pobre calidad, para ello se utilizó el programa Trimmomatic (Figura 12) (Bolger, et al., 2014).

Calidad de la secuencia antes de la depuración

Calidad de la secuencia después de la depuración

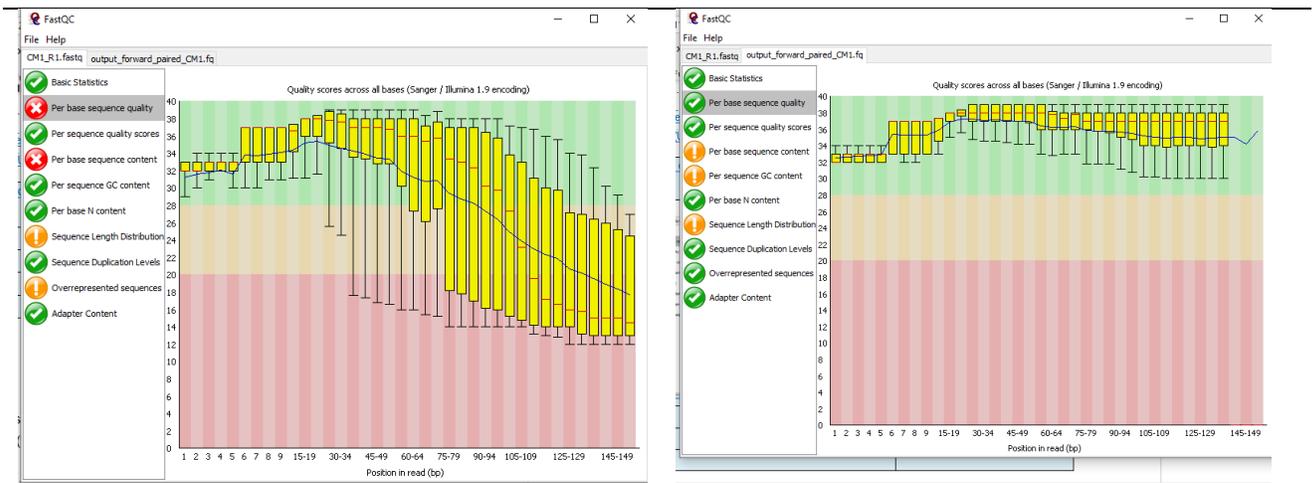


Figura 12. Ejemplo de la comparación de la calidad de las secuencias de *Salmonella* antes y después de la depuración (resultados de la muestra UNAM2018143_Sa_BB18).

Los datos de secuenciación crudos se encuentran disponible en la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Listado de los datos de las secuencias dentro de la base de datos de NCBI

Cepa	Serovar	BioSample	Cepa	Serovar	BioSample
UNAM2018113_Sa_BB12	Kentucky	SAMN15872719	UNAM2018122_Sa_AN12	Reading	SAMN12857423
UNAM2018143_Sa_BB18	Typhimurium	SAMN15872722	UNAM2018145_Sa_AN35	Typhimurium	SAMN12857435
UNAM2018142_Sa_BB17	Typhimurium	SAMN15872721	UNAM201726_Sa_AK86	Reading	SAMN12745980
UNAM2018114_Sa_BB13	London	SAMN15872720	UNAM201724_Sa_AK85	Anatum	SAMN12745979
UNAM2018148_Sa_BB19	Typhimurium	SAMN15872723	UNAM201744_Sa_AM50	London	SAMN12745991

UNAM201792_Sa_BB21	Kentucky	SAMN15872725	UNAM201743_Sa_AM49	London	SAMN12745990
UNAM201753_Sa_BB20	Anatum	SAMN15872724	UNAM201746_Sa_AM52	Reading	SAMN12745993
UNAM201789_Sa_AM78		SAMN12856892	UNAM201745_Sa_AM51	Reading	SAMN12745992
UNAM201751_Sa_AM56	Reading	SAMN12856886	UNAM201742_Sa_AM48	Reading	SAMN12745989
UNAM201798_Sa_AM87		SAMN12856896	UNAM201750_Sa_AM55	Reading	SAMN12745996
UNAM201752_Sa_AM57	Reading	SAMN12856887	UNAM201749_Sa_AM54	Reading	SAMN12745995
UNAM2018109_Sa_AM98	Anatum	SAMN12856900	UNAM201747_Sa_AM53	Reading	SAMN12745994
UNAM2018106_Sa_AM95	Anatum	SAMN12856899	UNAM201720_Sa_AM36	Reading	SAMN12745981
UNAM2018101_Sa_AM90	Anatum	SAMN12856898	UNAM201737_Sa_AM45	London	SAMN12745986
UNAM2018100_Sa_AM89	Anatum	SAMN12856897	UNAM201734_Sa_AM42	Muenster	SAMN12745984
UNAM201782_Sa_AM74	London	SAMN12856891	UNAM201736_Sa_AM44	Anatum	SAMN12745985
UNAM201761_Sa_AM63	London	SAMN12856889	UNAM201731_Sa_AM40	Anatum	SAMN12745983
UNAM201756_Sa_AM60	Reading	SAMN12856888	UNAM201730_Sa_AM39	Anatum	SAMN12745982
UNAM2018116_Sa_AN06	Reading	SAMN12856902	UNAM201740_Sa_AM47	London	SAMN12745988
UNAM201770_Sa_AM68	Anatum	SAMN12856890	UNAM201738_Sa_AM46	Anatum	SAMN12745987
UNAM2018115_Sa_AN05	Reading	SAMN12856901	UNAM201716_Sa_AK80		SAMN12345838
UNAM201794_Sa_AM83	Reading	SAMN12856894	UNAM201719_Sa_AK83	Reading	SAMN12345841
UNAM201790_Sa_AM79	Anatum	SAMN12856893	UNAM201711_Sa_AK77	Reading	SAMN12345835
UNAM201797_Sa_AM86		SAMN12856895	UNAM201712_Sa_AK78	Anatum	SAMN12345836
UNAM2018149_Sa_AN39	Typhimurium	SAMN12857438	UNAM201714_Sa_AK79	Anatum	SAMN12345837
UNAM2018147_Sa_AN37	Typhimurium	SAMN12857437	UNAM20171_Sa_AK67	London	SAMN12345825
UNAM2018146_Sa_AN36	Typhimurium	SAMN12857436	UNAM201718_Sa_AK82	Reading	SAMN12345840
UNAM2018150_Sa_AS56	Give	SAMN12857439	UNAM201723_Sa_AK84	Reading	SAMN12345842
UNAM2018125_Sa_AN15	London	SAMN12857426	UNAM201710_Sa_AK76	Anatum	SAMN12345834
UNAM2018134_Sa_AN24	Kentucky	SAMN12857429	UNAM20179_Sa_AK75	Anatum	SAMN12345833
UNAM2018133_Sa_AN23	Kentucky	SAMN12857428	UNAM201717_Sa_AK81	Anatum	SAMN12345839
UNAM2018132_Sa_AN22	Kentucky	SAMN12857427	UNAM20172_Sa_AK68	Typhimurium	SAMN12345826
UNAM2018136_Sa_AN26	Reading	SAMN12857430	UNAM20177_Sa_AK73	Anatum	SAMN12345831
UNAM2018124_Sa_AN14	Reading	SAMN12857425	UNAM20176_Sa_AK72	Anatum	SAMN12345830
UNAM2018123_Sa_AN13	Typhimurium	SAMN12857424	UNAM20175_Sa_AK71	Anatum	SAMN12345829
UNAM2018144_Sa_AN34	Typhimurium	SAMN12857434	UNAM20174_Sa_AK70	Anatum	SAMN12345828
UNAM2018140_Sa_AN30	Typhimurium	SAMN12857432	UNAM20173_Sa_AK69	Anatum	SAMN12345827
UNAM2018137_Sa_AN27	Kentucky	SAMN12857431	UNAM20178_Sa_AK74	London	SAMN12345832
UNAM2018141_Sa_AN31	Reading	SAMN12857433			

4 Ensamblado del genoma

Este proceso se llevó a cabo mediante el algoritmo SPAdes en el servidor PATRIC (Pathogen Resource and Integration Center) (Wattam, et al., 2014). En los genomas ensamblados se evaluó que tuvieran el menor número de contigs posible y que estos fueran de un tamaño grande. Además, se verificó que el tamaño del genoma fuera menor a 5,000,000 pb, que el porcentaje de GC se encontrará en 52% y el L50 tuviera un valor menor a 20; esto con el fin de asegurar el uso de ensamblados de

alta calidad y así tener una mayor confiabilidad en la anotación de los genomas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Calidad de los genomas ensamblados

Muestra	No. Contigs	N50	L50	Tamaño genoma	%GC
AK67	79	100,798	15	4'625,233	52.26
AK68	94	107,374	12	4'878,116	52.20
AK69	59	162,707	9	4'679,792	52.15
AK70	69	154,880	9	4'680,675	52.16
AK71	69	163,923	10	4'678,404	52.16
AK72	79	139,371	10	4'678,539	52.17
AK73	44	405,090	5	4'684,600	52.14
AK74	44	405,090	5	4'676,409	52.14
AK75	52	303,902	6	4'688,309	52.15
AK76	89	137,319	11	4'686,870	52.16
AK77	92	112,920	14	4'820,039	52.24
AK78	74	182,618	9	4'685,760	52.15
AK79	81	152,395	11	4'679,103	52.16
AK80	101	92,473	16	4'835,458	52.18
AK81	55	223,240	7	4'680,836	52.15
AK82	83	156,799	12	4'821,481	52.23
AK83	80	143,269	13	4'820,921	52.23
AK84	61	240,743	7	4'788,193	52.24
AK85	55	273,882	6	4'686,724	52.14
AK86	90	144,550	10	4'792,009	52.26
AM36	56	265,489	7	4'817,507	52.23
AM39	53	236,074	7	4'769,776	52.10
AM40	28	396,448	5	4'677,925	52.14
AM42	41	316,789	6	4'755,413	52.13
AM44	36	269,637	6	4'678,081	52.14
AM45	61	401,391	5	4'637,813	52.24
AM46	40	288,562	7	4'677,770	52.14
AM47	42	226,033	6	4'662,895	52.21

AM48	62	167,891	9	4'808,815	52.24
AM49	42	307,420	6	4'626,147	52.25
AM50	41	406,101	5	4'627,332	52.25
AM51	73	168,863	10	4'799,814	52.24
AM52	57	256,621	7	4'808,258	52.24
AM53	57	231,062	8	4'808,916	52.24
AM54	66	168,388	11	4'808,055	52.15
AM55	79	74,808	12	4'804,934	52.25
AM56	57	238,893	7	4'808,645	52.24
AM57	60	175,964	9	4'808,398	52.24
AM58	82	96,769	13	4'624,165	52.28
AM60	67	175,964	9	4'818,500	52.23
AM63	49	226,033	6	4'677,647	52.14
AM68	37	318,125	6	4'682,568	52.14
AM74	44	405,969	5	4'666,398	52.21
AM78	46	407,875	5	4'835,008	52.17
AM79	29	414,143	5	4'678,745	52.45
AM81	111	77,864	20	4'739,128	52.33
AM83	81	144,046	13	4'813,087	52.23
AM86	45	325,551	5	4'832,960	52.17
AM87	46	267,949	5	4'832,753	52.17
AM89	42	242,888	8	4'678,188	52.14
AM90	45	245,620	6	4'677,506	52.15
AM95	31	405,090	5	4'687,917	52.14
AM98	51	241,362	7	4'677,807	52.15
AN03	110	71,206	22	4'749,098	52.33
AN04	88	96,311	14	4'584,195	52.36
AN05	52	201,879	8	4'775,524	52.25
AN06	57	175,964	8	4'808,339	52.24
AN12	59	175,964	8	4'808,504	52.24
AN13	104	181,603	10	5'096,086	50.56
AN14	48	293,394	6	4'773,869	52.25
AN15	74	405,207	5	4'626,552	52.24
AN22	50	200,196	8	4'806,748	52.16
AN23	48	213,892	8	4'807,080	52.17
AN24	59	148,942	10	4'807,495	52.17

AN26	84	118,532	12	4'822,495	52.23
AN27	51	113,043	8	4'806,590	52.16
AN30	56	225,558	6	4'915,760	52.14
AN31	79	108,191	11	4'822,015	52.24
AN32	144	56,087	26	4'874,562	52.27
AN33	139	62,049	24	4'877,279	52.25
AN34	73	196,601	9	4'929,918	52.12
AN35	73	170,627	11	4'929,647	52.12
AN36	58	204,597	7	4'929,871	52.12
AN37	53	223,108	5	4'930,120	52.12
AN38	140	61,828	22	4'873,472	52.22
AN39	59	196,601	8	4'930,447	52.12
AS56	29	409,925	4	4'680,120	52.08

5 Predicción del serotipo

La predicción del serovar se realizó mediante un análisis *in silico*, usando los genomas ensamblados en el programa “*Salmonella* In Silico Typing Resource”, SISTR, por sus siglas inglesas (Yoshida et al., 2016). Este programa compara la secuencia de los genes de los antígenos somático (cluster de genes *rfb*, así como los genes *wzx* y *wzy*) y flagelar (*fliC* y *fljB*) de los genomas problema contra una base de datos curada que contiene los genes de referencia de ambos antígenos, utilizados para determinar el serotipo según el esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Grimont y Weill, 2007), además incluye el análisis de cgMLST y rMLST, volviéndolo un método más preciso.

6 Anotación del genoma

Todos los genomas ya ensamblados, se cargaron en el servidor RAST (Rapid Annotation Subsystem Technology) (Overbeek et al., 2014), el cual está

especializado en la anotación de genomas de células procariotas. Este procedimiento identifica las secuencias codificantes en los genomas ensamblados y en caso de conocerse, le asigna la función biológica que le corresponde. El servidor se programó de manera que corrigiera automáticamente los errores de cambios de marco de lectura (frameshift) que pudieran presentarse.

7 Identificación del perfil genómico de virulencia

El perfil de virulencia se desarrolló mediante un análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que incluyó un análisis bidireccional para encontrar alineaciones significativas. Se usaron 34 genes de referencia provenientes de la Base de Datos de Factores de Virulencia, con un punto de corte de probabilidad de 10^{-30} , con lo que se limitan las coincidencias debidas al azar (Chen et al. 2016). El porcentaje de identidad resultante se utilizó para construir un mapa de calor, con ayuda del programa Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

Cuadro 6. Genes incluidos en el perfil genómico de virulencia

Función	Genes
Adhesión	<i>csgA, fimA, misL, shdA, sinH, lpfA, ratB</i>
Regulación del proceso infeccioso	<i>hilAD, phoPQ, siiE</i>
Captación de hierro	<i>Fur, fhuA, iron, tonB, exbB</i>
Resistencia al estrés	<i>rpoHS, adA, proP, fabA, fepA</i>
Toxinas	<i>cdtB, ptlA, hlyE</i>
Supervivencia intracelular	<i>St313-TD</i>
Plásmido de virulencia	<i>spvABRCD, pefABCD, rck</i>

8 Análisis comparativos de islas de patogenicidad de *Salmonella*

Se comparó también el perfil de 12 SPI de la bacteria con las secuencias de referencia de la base de datos de SPI (PAIDB) (Yoon et al., 2015). Para las primeras

5 islas, se utilizó como genoma de referencia a *Salmonella enterica* subps. *enterica* ser. Typhimurium LT2; mientras que para el resto de las islas (6-12), se utilizaron las secuencias de *Salmonella enterica* subps. *enterica* ser. Typhi CT18. El perfil de las SPI se comparó mediante un atlas de BLAST de proteínas en el servidor GView (Arndt et al., 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Perfil de virulencia de las cepas de salmonella obtenidas de carne molida y linfonodos de bovino

Se determinó el perfil de virulencia de 77 cepas provenientes de carne molida y linfonodos de bovinos, el cual está compuesto por análisis de BLAST de 34 genes de virulencia y 12 SPI. Primero se detallará el perfil de los 34 genes separados por la función que desarrollan durante el proceso infeccioso y posteriormente se abarcará el análisis de las SPI.

1.1 Factores de adhesión

Los genes involucrados en el proceso de adhesión, incluidos en este estudio, fueron tanto genes codificantes de fimbrias (*csgA*, *fimA*, *lpfA*), como proteínas de adhesión (*misL*, *ratB*, *shdA*, *sinH*) que le permiten a la bacteria adherirse a las células hospederas (Ganji et al., 2019; Figueroa y Verdugo, 2005).

En ambos tipos de muestras, carne molida y linfonodos, los principales genes encontrados fueron *csgA*, *fimA*, *misL*, y *sinH*, ya que se presentaron en todas las cepas, con una identidad $\geq 95\%$; seguido por el gen *shdA* el cual también estuvo presente en todas las cepas, pero con un porcentaje de identidad $\geq 85\%$. La alta presencia de genes involucrados con la adhesión puede deberse a que está reportado que esta bacteria cuenta con más de 20 genes relacionados con esta función, de los cuales se sabe que cada bacteria es capaz de expresar al menos seis de ellos (Ganji et al., 2019; Bäumlér et al., 1996).

En las cepas provenientes de carne, los genes *lpfA* y *ratB* se encontraron únicamente en el 71% de las cepas con un porcentaje de identidad $\geq 98\%$. Mientras que en los aislamientos obtenidos a partir de linfonodos el gen *lpfA* se encontró únicamente en el 65% de las cepas y *ratB* en 48%, con identidades mayores al 97 y 85% respectivamente. La prueba de asociación de χ^2 entre la presencia de los genes con el tipo de muestra no resultó significativa. En general, la presencia de los genes de adhesión se encuentra de forma similar en ambos tipos de muestra. El hecho de que estos genes estén en todas las cepas puede estar relacionado con la importancia que representa la adhesión en el proceso patogénico, ya que es el primer contacto directo que existe entre la bacteria y el hospedero, el cual puede representar el éxito o fracaso del desarrollo del proceso infeccioso.

En cuanto a las diferencias entre serotipos, encontramos que todas las cepas de los serotipos Anatum, Give y Muenster carecen de las fimbrias polares largas (gen *lpfA*), hecho que concuerda con la investigación desarrollada por Gupta et al. (2019) en la que también se reportó la ausencia de este gen en estos serotipos, así como la ausencia de *ratB* en las cepas del serotipo Anatum, como en nuestro estudio. Este mismo gen tampoco se encontró en los serotipos Kentucky y Fresno. En estos dos últimos serotipos están presentes el resto de los genes relacionados con la adhesión con una identidad mayor a 97%, excepto en *shdA* ya que mostraron un 85 y 89% de identidad respectivamente. Sin embargo, la ausencia del gen *lpfA* y *ratB* en estas cepas podría no significar un problema en la capacidad de adhesión de estas bacterias debido a la gran variedad de genes reportados en *Salmonella* que cumplen con esta función.

En los serotipos London, Reading y Typhimurium se encontraron todos los factores de adhesión estudiados. El serotipo London presentó todos los genes con una identidad $\geq 95\%$, excepto para el gen *shdA* cuya identidad fue de 91%; Reading tuvo el 95% de identidad o más en todos los factores de adhesión en las 22 cepas analizadas y por último las 11 cepas del serotipo Typhimurium presentaron todos

los genes con 100% de identidad, excepto en *misL* y *shdA* con un promedio de 99% y 98%, respectivamente. Encontrar todos los genes con alta identidad únicamente en el serotipo Typhimurium puede deberse a que es un serotipo considerado de gran potencial patogénico y a que la mayoría de los datos de referencia utilizados provenían de *Salmonella enterica* subps. *enterica* ser. Typhimurium LT2 (Langridge et al., 2015; Wingstrand y Aabo, 2014).

La Figura 13 muestra que los factores de adhesión más conservados fueron *csgA*, presente en todas las cepas con 100% de identidad; seguido por *fimA*, *sinH* y *misL* los cuales estuvieron presentes en todas las cepas con un porcentaje de identidad $\geq 96\%$. Resultados similares fueron reportados por Delgado et al. (2018), en donde estos cuatro genes también estaban altamente conservados en diferentes serotipos de *Salmonella enterica* provenientes de bovinos y carne molida ya que presentaron una similitud $\geq 90\%$; lo que podría implicar que estos son importantes en las cepas involucradas con bovinos, ya que se ha reportado que la inactivación o ausencia de los diferentes genes de adhesión son los causantes de la diversidad y especificidad de hospederos en este género bacteriano (Landgridge et al., 2015).

Sin embargo, todas las variaciones aquí reportadas deben tener poca repercusión en la habilidad del patógeno para adherirse a las células epiteliales, tomando en cuenta la redundancia funcional que presenta la bacteria en estos genes.

1.2 Supervivencia intracelular

Está bien documentado que la presencia de genes como el *st313-td*, genes del SST-3 de la SPI-2 (como *ttr*) y genes pertenecientes al plásmido de virulencia están involucrados con enfermedades sistémicas, ya que le permiten a la bacteria internalizarse y sobrevivir dentro de los macrófagos (Herrero-Fresno et al., 2014;

Figuroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000; Cornelius et al., 1998). Debido a su importancia, se evaluó su presencia en las cepas analizadas en este estudio.

Los genes del SST-3 de la SPI-2 y el plásmido de virulencia, se abordarán más adelante; mientras que el gen *st313-td*, únicamente lo encontramos en una cepa proveniente de linfonodos y en ninguna de carne molida; lo cual podría deberse a la contribución de este gen en infecciones sistémicas, ya que se sabe que su ausencia causa una disminución de la virulencia en ratones, así como su presencia incrementa la capacidad de la bacteria de sobrevivir dentro de los macrófagos (Herrero-Fresno et al., 2014). Respecto a los serotipos, la única cepa con el gen *st313-td* pertenece al serotipo Muenster, el cual mostró un 94% de identidad.

Encontrar el gen *st313-td* solo en el serotipo Muenster fue un hallazgo importante, ya que únicamente se ha reportado en los serotipos Typhimurium y Dublin. Además, detectarlo en una cepa proveniente de linfonodos de bovino es otro hecho relevante, ya que la presencia del gen solo se ha observado previamente en cepas provenientes de aislamientos de humanos (Herrero-Fresno et al., 2014;). Por lo que, si el gen en la cepa del serotipo Muenster le confiere la misma función que en los serotipos donde se ha estudiado, implicaría que ésta representa un alto riesgo para la salud humana y podría ser capaz de desarrollar un proceso patogénico sistémico.

1.3 Toxinas

Los genes codificantes de toxinas incluidos en el estudio fueron *cdtB*, *ptIA* y *hlyE*; los primeros dos desarrollan un papel importante en la patogenia de *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi, ya que le permiten a la bacteria unirse al ácido N-acetilneuramínico, el cual se encuentra de forma predominante en los humanos en comparación con otros animales favoreciendo su especificidad. Además, se sabe que esta toxina tifoidea es capaz de detener el ciclo celular de las células

hospederas al causar daño en su ADN (Gao et al., 2017; Haghjoo y Galán, 2004). Mientras que el gen *hlyE* codificado en la SPI-18 se encarga de producir una hemolisina E formadora de poros que se expresa de forma intracelular.

Los tres genes se encontraron únicamente en el 4% de las cepas provenientes de linfonodos con una identidad mayor al 95%, es decir únicamente en dos de las 49 cepas; mientras que no se encontró en ninguna de las 28 cepas provenientes de carne molida. Este resultado implica que las dos cepas provenientes de linfonodos que presentan estos genes pueden presentar un riesgo para la salud humana, ya que a estos genes se les ha relacionado con especificidad del hospedero (Gao et al., 2017).

Sólo una cepa del serotipo Give y una del serotipo Muenster portan los genes *cdtB* y *ptlA*, ambas con una identidad de 100% y 98.76%, respectivamente. Estos genes han sido reportados previamente en un número limitado de cepas no tifoideas, en las que aún se desconoce su verdadera función. Ejemplo de ello son los estudios de den Bekker et al. (2011) y Delgado et al. (2018), quienes encontraron al igual que nosotros ambos genes presentes en cepas de *Salmonella* no tifoideas, entre ellas los serotipos Give y Muenster.

Igualmente, el gen *hlyE* solo se encontró en los serotipos Muenster y Give, con una identidad de 98%. La presencia en el serotipo Give concuerda con lo reportado por den Bakker et al. (2011), ya que lo encontraron en el genoma de serotipos tifoideos, así como en algunos no tifoideos entre ellos, Give y Montevideo. Delgado et al. (2018) también reportaron la presencia de este gen en los serotipos Muenster y Give, donde observaron que se encontraba altamente conservado en cepas no tifoideas provenientes de diferentes fuentes, incluidas cepas obtenidas de bovinos y carne molida.

Al encontrar estos genes formando parte del genoma de las cepas obtenidas de linfonodos podemos resaltar la importancia de estos como reservorios de bacterias virulentas las cuales pueden ser capaces de desarrollar una toxina tifoidea funcional, tal como lo demostraron Rodríguez-Rivera et al. (2015) y Miller y Wiedmann (2016), quienes reportaron una asociación significativa del incremento de células que presentan interrupción de su ciclo con la infección de serotipos de *Salmonella* no tifoideos que codifican a la toxina.

1.4 Regulación del proceso infeccioso

Los genes involucrados en los mecanismos de regulación del proceso infeccioso que se evaluaron en el estudio fueron *phoPQ*, *hilAD* y *siiE*. Los genes *phoPQ* se sabe que están involucrados en el desarrollo de enfermedades invasivas y sistémicas, ya que participan en la supervivencia intracelular de la bacteria (Gupta et al., 2019; Figueroa y Verdugo, 2015; Vivek Bajaj et al., 1995). Los genes *hilAD* son necesarios para la activación de genes relacionados con la invasión, ya que regulan la transcripción de genes del SST-3 de la SPI-1 (Fardsanei et al., 2017). Por último, el gen *siiE* participa en la infección del epitelio intestinal y favorece la persistencia de la bacteria (Fabrega and Vila, 2013; Morgan et al., 2007).

En las muestras provenientes de linfonodos y carne molida todas las cepas presentaron los genes *hilA* y *phoPQ* con una identidad $\geq 99\%$. El gen *hilD* estuvo presente en todas las cepas provenientes de linfonodos con una identidad $\geq 95\%$, mientras que el 96% de las cepas de carne lo presentaron con la misma identidad.

Todos los aislamientos provenientes de carne molida presentaron el gen *siiE* con una identidad $\geq 98\%$, mientras que el 87% de las cepas aisladas de linfonodos (43 de 49) presentaron el gen con una identidad $\geq 97\%$. El 13% de las cepas de linfonodos restantes tuvieron el 78% de identidad. Debido a que *siiE* está

involucrado en la colonización intestinal de los bovinos, la modificación de este gen en cepas provenientes de linfonodos, podría indicar que estas se internalizan en ellos por vías diferentes a la intestinal. Un ejemplo de ello es el estudio de Edrington et al. (2016), en el cual inocularon novillos de forma intradérmica con la bacteria y lograron aislarla en diferentes linfonodos.

Es importante recalcar que los genes *phoPQ* se encontraron en todos los aislamientos, con una identidad del 100% sin importar el serotipo, por lo que se puede decir están conservados, seguramente debido a su participación fundamental en la patogenia de la salmonelosis. Además, se sabe que cuando se presentan mutaciones en esta región, las bacterias se vuelven más sensibles a los tratamientos ácidos, ya que se altera la capacidad de la bacteria de desarrollar una respuesta ácido tolerante (ATR) (Bearson et al., 1998).

En cuanto a los genes *hilAD*, la identidad que se obtuvo en casi todos los serotipos fue entre 99 y 100%, siendo la excepción la *Salmonella* Typhimurium monofásica, ya que *hilD* no se detectó en su genoma. Además, se ha reportado que cuando existen mutaciones en el gen *hilA* en cepas del serotipo Typhimurium se presenta una atenuación en las infecciones del ganado, ya que disminuye significativamente la habilidad de las bacterias para internarse en las células de su hospedero (Tsolis et al., 2000; Vivek Bajaj et al., 1995).

Por último, el gen *siiE* se encontró en todos los serotipos con identidades altas, ya que presentaron valores superiores a 97%, con excepción de las cepas del serotipo Kentucky quienes presentaron el gen con un porcentaje de identidad de 78%. Cuando existen mutaciones en esta región del genoma la habilidad de las bacterias para colonizar el intestino en el ganado disminuye, por lo que esta característica puede ser considerada fundamental para el establecimiento exitoso de la enfermedad (Fabrega and Vila, 2013; Morgan et al., 2007), y debido al alto grado

de conservación del gen en las cepas del estudio podemos suponer que estas no presentarían este problema.

En resumen, encontrar los genes asociados con la regulación del proceso infeccioso con un alto grado de conservación era una característica esperada, ya que todos desempeñan un papel importante en la supervivencia de la bacteria durante los diversos estadios del proceso infeccioso.

1.5 Captación de hierro

Es bien sabido que las cepas no tifoideas de *Salmonella* poseen diversos mecanismos para la captación y el metabolismo del hierro, mineral que juega un papel central en el proceso infeccioso (Zhigang et al., 2019), por lo que en este estudio se buscaron genes (*fur*, *iroN*, *fhuA*, *tonB* y *exbB*) involucrados en este proceso.

La presencia de los cinco genes se observó en casi todos los aislamientos provenientes tanto de carne molida como de linfonodos, con excepción de dos cepas de carne molida. Los genes *fur*, *fhuA*, *tonB* y *exbB* tuvieron un alto porcentaje de identidad en todas las cepas con valores $\geq 98\%$, mientras que el gen *iroN*, se encontró también en casi todos los aislamientos con identidades $\geq 99\%$, a excepción de dos muestras de carne, las cuales no presentaron el gen.

En la comparación entre serotipos, observamos que todos los aislamientos presentaron el gen *fur* con 100% de identidad, lo cual nos permite suponer que todas las cepas incluidas en el estudio tienen al menos una fuente segura para la adquisición de hierro. Este gen se ha demostrado que es importante en la supervivencia de la bacteria, ya que se ha observado que la presencia de

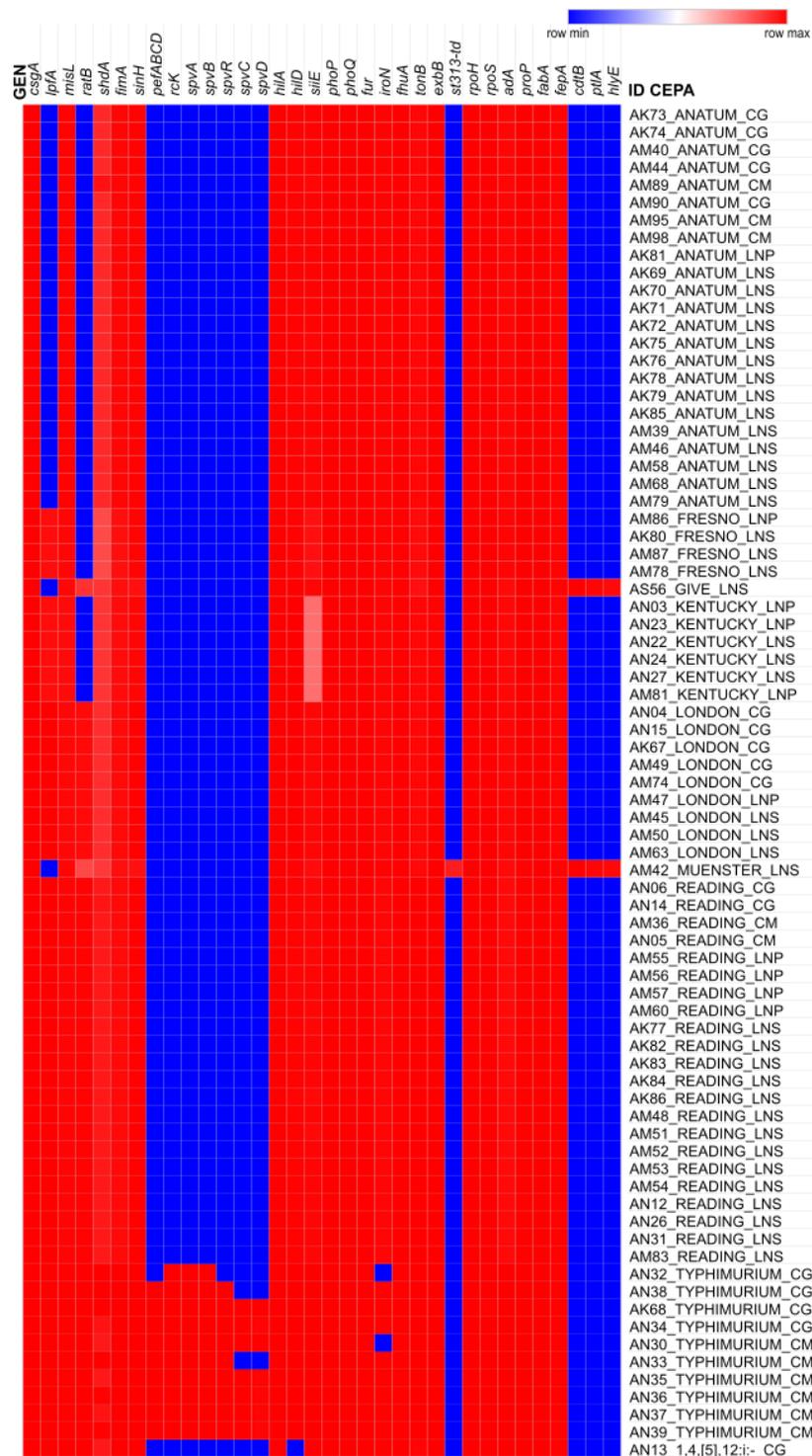


Figura 13. Perfil de virulencia de 77 cepas de *S. enterica* asociadas con ganado bovino. Los genes están codificados en el mapa de calor según el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos, con respecto a las proteínas de referencia en la base de datos de factores de virulencia (Chen et al., 2016). El serotipo y la fuente de aislamiento se indican en la identificación de las cepas; CG: carne con grasa, CM: carne magra, LNS: linfonodos superficiales, LNP: linfonodos profundos.

mutaciones en él causa fenotipos deficientes en la producción de la ATR (Foster, 1993).

En cuanto al gen *fhuA*, se encontró con una identidad del 100% en los serotipos Anatum, London, Reading y en dos cepas del serotipo Typhimurium, así como con 99% de identidad en Fresno, Give, Kentucky, Muenster y nueve cepas de *S. Typhimurium*. El gen *iroN* se detectó con una identidad $\geq 99\%$ en todos los serotipos incluidos en el estudio, con excepción de dos cepas del serotipo Typhimurium, las cuales no presentaron el gen; mientras que los genes *tonB* y *exbB* presentaron valores de 97-100% de identidad en todos los serotipos. Zhigang et al. (2019) demostraron que cepas mutantes en estas dos regiones (*iroN*, *tonB*) crecen de forma retardada en comparación con una de tipo salvaje, además disminuye su capacidad de invasión y presentación de daño en células Caco-2, por lo que podríamos asumir que las bacterias del estudio no presentarían este tipo de problemas.

La presencia de estos genes en las cepas bajo estudio, con una alta identidad, nos permite reafirmar su importancia clínica tanto para la salud humana como animal, ya que son factores de virulencia que se sabe pueden determinar el éxito del establecimiento del proceso infeccioso.

1.6 Infecciones asintomáticas

Los genes, *lpfA*, *misL* y *siiE*, están involucrados en el establecimiento de infecciones asintomáticas que le permiten a la bacteria permanecer en el epitelio intestinal durante mayor tiempo (Silva y López, 2012; Morgan et al., 2007). El gen *lpfA* le facilita a la bacteria la colonización del ciego (Silva y López, 2012); el gen *misL* se ha asociado con la colonización intestinal crónica en murinos y aves, ya que le permite a la bacteria unirse a la fibronectina y causar agregados bacterianos

(Naughton et al., 2001; Silva and López, 2012). Por último, el gen *siiE* es importante en la capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio intestinal (Morgan et al., 2007).

Como se mencionó antes, los genes *lpfA*, *misL* y *siiE* se encontraron en la mayoría de las cepas con altos porcentajes de identidad; su presencia podría indicar que estas cepas son capaces de permanecer en el hospedero y secretarse en las heces por más de 30 días (Silva y López, 2012), así como de adherirse al epitelio intestinal; en el estudio de Morgan et al. (2007) reportaron que al no encontrarse *siiE* en las bacterias, estas presentan una disminución en la adhesión.

En general podemos apreciar que estos son genes que se encuentran ampliamente conservados entre todos los serotipos incluidos en el estudio sin importar el tipo de muestra del que provenga la cepa.

1.7 Resistencia al estrés

Otra parte importante en el desarrollo del proceso infeccioso es la capacidad de la bacteria para adaptarse y/o responder ante situaciones de estrés. Por ello, en este estudio se analizó la presencia de genes involucrados en este proceso (*rpoH*, *rpoS*, *adA*, *proP*, *fabA*, *fepA*).

Los genes que se encontraron con 100% de identidad en todos los aislamientos obtenidos de linfonodos fueron *rpoHS* y *fabA*; el resto de los genes se encontró en todos los aislamientos pero con identidades mayores a 98%. Los aislamientos provenientes de carne molida mostraron un mayor grado de conservación en los genes ya que la mayoría se encontró con un 100% de identidad en todas las cepas; únicamente los genes *adA* y *fepA*, mostraron identidades de 98 a 99% en estos aislamientos. El hecho de que estos genes se encuentren altamente conservados

puede ser por la importancia que tienen durante la supervivencia de la bacteria en los estadios del proceso infeccioso.

Los genes, *rpoH*, *rpoS* y *fabA* estuvieron presentes en todos los aislamientos pertenecientes a cada serotipo con identidad de 100%. El gen *proP* también se encontró en la mayoría de los serotipos con una identidad de 100%, a excepción de Muenster y Reading, en los cuales presentaron un 99% de identidad. Los dos genes con menor identidad fueron *fepA* y *adA*, con 98 y 99% de identidad en todos los serotipos respectivamente. Encontrar los genes *rpoH*, *rpoS*, *adA*, *proP*, *fabA*, y *fepA* en todas las cepas con identidades altas sugiere que todas las cepas son capaces de establecer una respuesta eficiente ante el estrés y por lo tanto de sobrevivir. Se ha demostrado que al existir mutaciones en genes como *rpoS* y *fepA* las bacterias se vuelven susceptibles al pH ácido, por lo que su capacidad de supervivencia disminuye y con ello desarrollan una marcada atenuación en la virulencia en ratones infectados por vía oral (Rychlik y Barrow, 2005).

En otro estudio desarrollado por el equipo de Chadiuhuri et al. (2013), encontraron que *fepA* es parte fundamental en el proceso de infección oral en el ganado bovino de las cepas Typhimurium, recalcando la importancia de estos genes durante el proceso infeccioso, y como en este estudio se encontró en todas las cepas con una identidad mayor al 99%, se entiende que todas las cepas evaluadas podrían ser capaces de infectar a los bovinos.

1.8 Plásmido de virulencia

En el estudio también se incluyeron factores de virulencia asociados con fenotipos hiperinvasivos, tales como el gen *rck* y los operones *pef* y *spv*. Estos, en conjunto con otros genes forman el plásmido de virulencia, el cual promueve la supervivencia y el rápido crecimiento de la bacteria dentro de los macrófagos de los hospederos,

lo que le permite a la bacteria diseminarse a través del sistema linfático, incrementando así su virulencia (Leekitcharoenphon et al., 2016; Cornelius et al., 1998).

Este plásmido de virulencia solo se encontró en cepas provenientes de carne molida. En este sentido, cabe destacar que el patógeno puede llegar a la carne por diversas vías, tales como el contacto de las canales con la piel o con las heces del animal durante el proceso de matanza; o bien, debido a la inclusión de pequeños linfonodos y hemolinfonodos en la carne molida, los cuales a menudo se encuentran asociados con el tejido muscular y adiposo (Gragg et al., 2013; Brichta-Harhay et al., 2012). No obstante, la presencia del plásmido de virulencia parece estar más asociado con el serotipo que con la fuente de aislamiento, ya que solo se detectó en las diez cepas del serotipo Typhimurium, el cual suele portar esta característica genómica. Particularmente en cepas hipervirulentas, como *S. Typhimurium* DT104, una cepa de importancia epidemiológica global, capaz de desarrollar enfermedades tanto en humanos como en el ganado (Leekitcharoenphon et al., 2016; Cornelius et al., 1998).

1.9 Islas de patogenicidad

Otros factores que se cree pueden ser indicativos de la especificidad de los diferentes serotipos de *Salmonella* son las islas de patogenicidad. Por ello, en este trabajo se abordó el estudio de 12 de estas islas (Figura 14).

En primera instancia se realizó un análisis preliminar de las islas agrupadas por serotipo. Al encontrar que estas se comportaban de forma idéntica, se eligió una cepa representativa de cada serotipo.

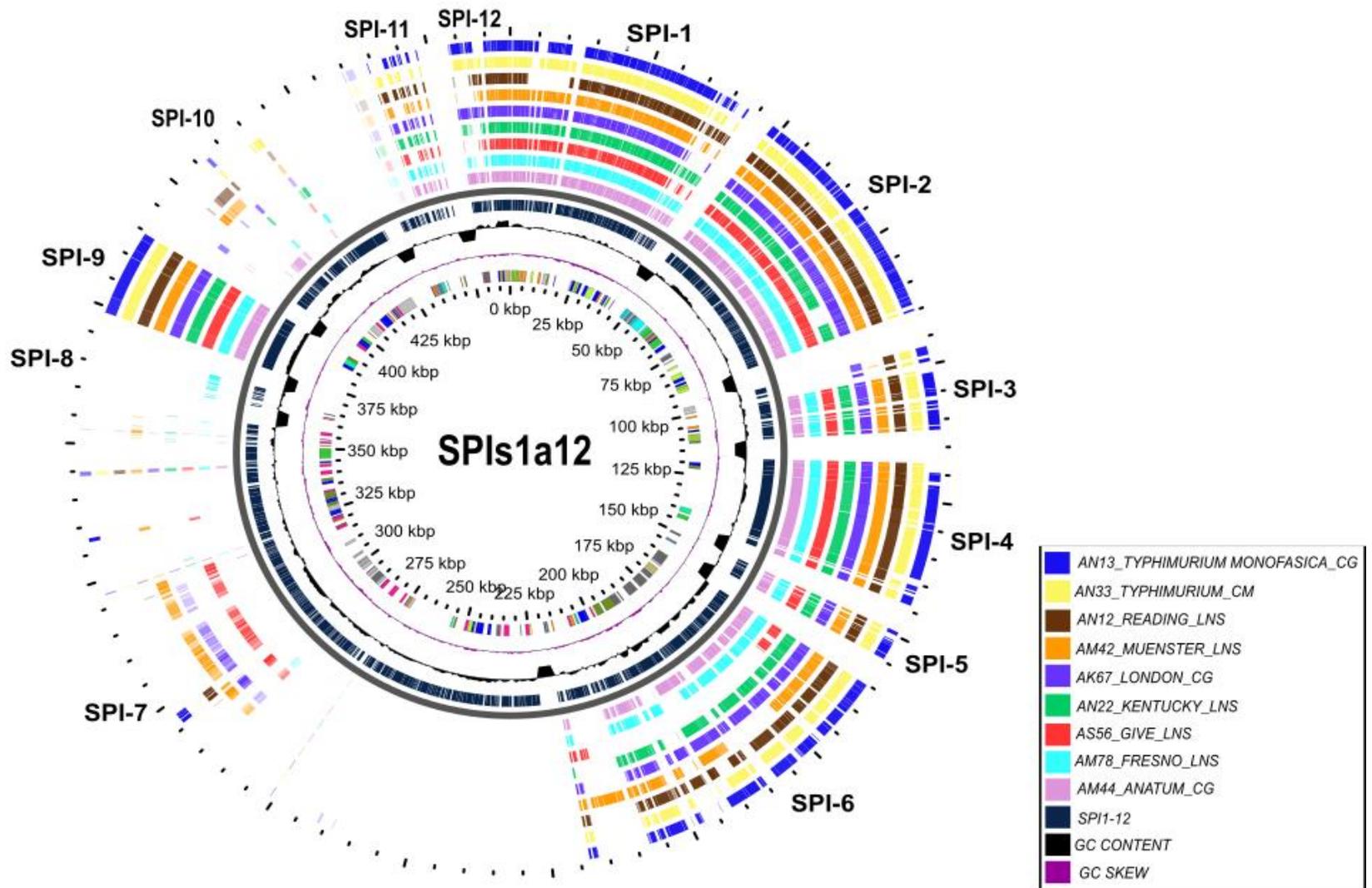


Figura 14. Atlas de BLAST de las SPIs 1-12 de cepas de *S. enterica* asociadas con ganado bovino, generado con el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

SPI-1 y 2

En la Figura 15 podemos observar que ambas islas, en general, se encontraron conservadas en todos los aislamientos del estudio. Las diferencias que observamos en la SPI-1 fueron en AN12_Reading_LNS, cepa con gran variación, en la cual no estaban presentes los genes *sitD*, *prgH* y *orgB*, mientras que *hilD* estaba de forma parcial. En la cepa AN13_Typhimurium monofásica_CG también está ausente el gen *hilD*. Además, se encontró que el gen *sirC* está ausente en ambas cepas, AN12 y AN13. Otra singularidad en la SPI-1 es que el gen *sipD* se presentó de forma incompleta en las cepas AM42_Muenster_LNS y AS56_Give_LNS, mientras que el gen *pphB* no se encontró en AK67_London_CG.

Con respecto a la SPI-2, se encontraron variaciones en tres cepas, AN13_Typhimurium monofásica_CG y AN33_Typhimurium_CM, ambas sin la región de los genes *spiC* y *ssaU*; mientras que AN22_Kentucky_LNS no presenta los genes *ssaVNOP*.

Debido a que no se presentaron patrones de ausencia de genes entre los tipos de muestra (carne y linfonodos) podríamos asumir que estas variaciones dependen del serotipo, tal y como se ha reportado anteriormente (Gupta et al. 2019). Además, debido a que algunas de nuestras cepas mostraron la ausencia de ciertos genes del SST-3, podríamos suponer que podrían tener una deficiente codificación de este. Sin embargo, el SST-3 codificado en SPI-1 no es el único mecanismo de invasión de *Salmonella*, por lo que no puede descartarse la idea de que estas colonicen a los bovinos mediante mecanismos alternativos. La presencia de estas cepas en las muestras analizadas, a pesar de la carencia de ciertos genes de la SPI-1, es evidencia de ello. Además, se debe tomar en cuenta que las SPI se han integrado al genoma de *Salmonella* mediante transferencia horizontal, por lo que en ciertos serotipos y/o condiciones ecológicas, algunas regiones de la SPI-1 muestran

inestabilidad, tal y como se ha observado en estudios previos (Delgado-Suárez et al., 2018; Hensel, 2004; Amavisit et al., 2003).

SPI-3

La SPI-3 es indispensable para la supervivencia intracelular en macrófagos, ya que le brinda a la bacteria mecanismos de obtención de productos esenciales para su crecimiento en condiciones limitadas de magnesio (*mgtCB*), además de presentar genes como *marT* y *misL*, a los que se han involucrado con infecciones crónicas y con la especificidad del hospedero (Figuroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000). También aquí se codifican los genes *rmbA*, *rhuM* y *sugR*; los dos primeros codifican una proteína citoplasmática, mientras que *sugR* codifica a una proteína de unión a ATP (Martínez, 2007). De estos tres genes aún no se sabe su función específica, pero al encontrarse dentro de la SPI-3 se cree que también desarrollan funciones involucradas con la supervivencia intracelular; además se sabe que *rmbA* participa en el proceso de formación de biopelículas (Eran et al., 2020; Maldonado, 2015; de Toro et al., 2014; Blanc-Potard et al., 1999).

Esta isla mostró una alta preservación en los genes relacionados con la captación de magnesio ubicados en esta región (*mgtACB*) así como la presencia de *misL* y *marT*, ya que estuvieron presentes en todas las cepas, sin importar el serotipo ni la fuente. Las cepas que mostraron ausencia de genes fueron AN13_Typhimurium_monofásica_CG, la cual no presentó el gen *rmbA*; mientras que las cepas AM42_Muenster_LNS, AN22_Kentucky_LNS, AS56_Give_LNS, AM78_Fresno_LNS y AM44_Anatum_CG no presentaron los genes *sugR* y *rhuM*, evidenciando una vez más que las diferencias encontradas se presentan únicamente entre serotipos, sin que el tipo de muestra afecte la presencia o ausencia de los genes. En un estudio realizado por Amavisit et al. (2003), se

encontró que la presencia de esta isla y sus genes fue muy variable en todos los serotipos de *S. enterica* incluidos en su estudio, como Typhimurium y Ohio.

SPI-4

La SPI-4 codifica un SST-1 que contribuye a la colonización intestinal en los bovinos, participa en la adaptación al ambiente intracelular en los macrófagos y media la secreción de toxinas (Figuroa and Verdugo, 2005; Marcus et al., 2000). Elementos importantes de esta isla son los genes *siiABCDEF*, ya que participan en la fase inicial de la infección en el epitelio intestinal y favorecen la persistencia de la bacteria (Fabrega and Vila, 2013; Tünde Kiss et al., 2007).

Esta isla mostró variaciones en tres cepas (Figura 16), la primera fue la ausencia de *siiADF* en AN13_Typhimurium_monofásica_CG; mientras que en AN33_Typhimurium_CM se observó la presencia parcial de *siiE* así como la ausencia de *siiF*. Por último, en AN22_Kentucky_LNS también se encontró de forma parcial el gen *siiE*. Debido a lo reportado por Morgan et al. (2007) y Tünde et al. (2007), se puede inferir que estas cepas son deficientes en la colonización del epitelio intestinal, ya que presentan solo regiones parciales de *siiDEF*; igualmente podrían presentar baja posibilidad del desarrollo de una enfermedad sistémica en ratones, aunque por la redundancia funcional de genes, esto podría no cumplirse. Es importante recalcar que las variaciones observadas, solo se pueden relacionar entre serotipos y no entre fuentes de aislamiento.

SPI 1-3

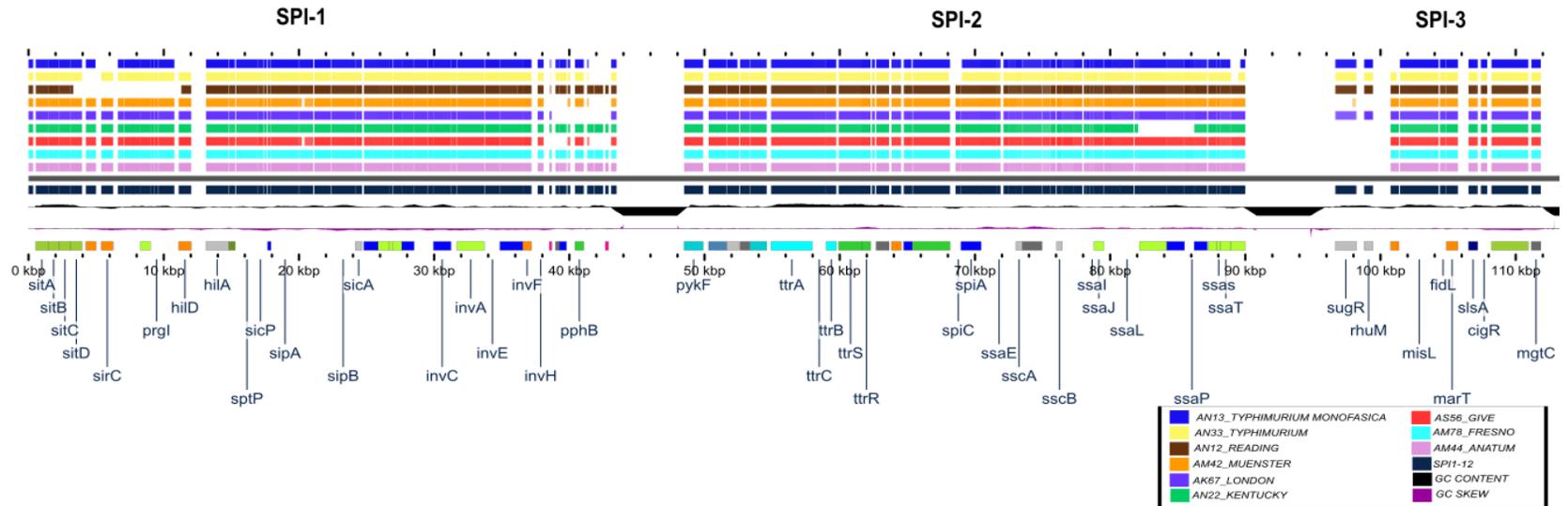


Figura 15. Atlas de BLAST de las SPI 1-3 de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino, mapa generado con el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

SPI-5

La SPI-5 alberga factores de virulencia que son importantes en la inflamación y la secreción clorhídrica, característica de la fase entérica de la enfermedad (Marcus et al., 2000). Además, codifica proteínas efectoras del SST-3 de las SPI-1 y SPI-2, gracias a los genes *pipAB*, *sopB* y *sigE*, los cuales bajo el control de otros genes, tal como *ssrAB* e *hilA*,

comienzan con la producción de estas proteínas que le permiten a la bacteria desarrollar rearrreglos en el citoesqueleto de las células hospederas para su internalización (Delgado, 2019; Sabbagh et al., 2010; Hensel et al., 2004).

En el estudio, encontramos que *sopB* y *sigE* estuvieron presentes en todos los aislamientos sin importar el tipo de muestra o serotipo; mientras que el gen *pipA* se encontró en la mayoría de los serotipos, con excepción de AS56_Give_LNS y AM42_Muenster_LNS, los cuales presentaron una delección al final de esta región. También, es posible observar que *pipB*, se encuentra solo de forma parcial en AN13_Typhimurium monofásica_CG. Estos resultados podemos observarlos en la Figura 16 y concuerdan con lo reportado por den Bakker et al. (2011), ya que ellos también encontraron esta isla en los serotipos Typhimurium, Kentucky y Reading. Se ha demostrado que cuando existen mutaciones en *pipAB* y *sopB* la respuesta secretora disminuye en los bovinos (Marcus et al., 2000), lo que nos lleva a suponer este tipo de comportamiento en las tres cepas anteriormente reportadas.

SPI-6

La SPI-6 participa en la fase tardía en la invasión de los macrófagos y células epiteliales por la bacteria, debido a que aquí se codifica un SST-6 y un operón fimbrial, *safA-D* (Brunet et al., 2015; Langridge et al., 2015).

Esta isla presentó una gran variación en este estudio (Figura 16), ya que ninguna de las cepas la presentó por completo. En la Figura 16, se observa que AS56_Give_LNS fue la cepa más incompleta en esta región, ya que solo presentaba regiones parciales de la isla al inicio y final. Un hallazgo interesante, es que todas las cepas provenientes

de carne (AN13, AN33, AK67 y AM44) fueron las que presentaron la mayor parte de la isla, al contrario de las cepas provenientes de linfonodos; lo cual resulta intrigante, ya que esperaríamos que la isla estuviera mejor conservada en cepas provenientes de linfonodos, debido a la función que realiza. Sin embargo, no podemos descartar la presencia de macrófagos circulantes en los vasos sanguíneos de la carne, lo cual podría explicar la presencia de estos genes únicamente en las cepas provenientes de carne. Esto también podría estar relacionado con la presencia de otros genes involucrados en la cronicidad de la bacteria en su hospedero, ya que se ha demostrado que la codificación del SST-6 por la SPI-6 en cepas de *S. Typhimurium* puede regular la virulencia y cronicidad de la bacteria en ratones (Parsons y Heffron, 2005).

Además, se ha reportado que la delección de esta isla reduce la capacidad de invasión de *S. Typhimurium* a las células Hep2, por lo que podríamos suponer que las cepas provenientes de linfonodos presenten una menor invasividad durante el proceso infeccioso (Folkesson et al., 2002).

También se sabe que esta isla se encuentra ampliamente distribuida dentro de los diferentes serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, incluidos los serotipos Typhimurium, Kentucky y Typhimurium monofásica (4,[5],12: i:-), tal como se puede observar en la Figura 16. Asimismo, se sabe que el tamaño de la región codificante del SST-6 depende del serotipo en el que se evalúe, pudiendo ir de 35 a 50 kb. Además, se ha sugerido que en *S. Typhimurium* monofásica y Cholerasuis este SST no es funcional, debido a una modificación que estos serotipos presentan en su codificación (Blondel et al., 2009).

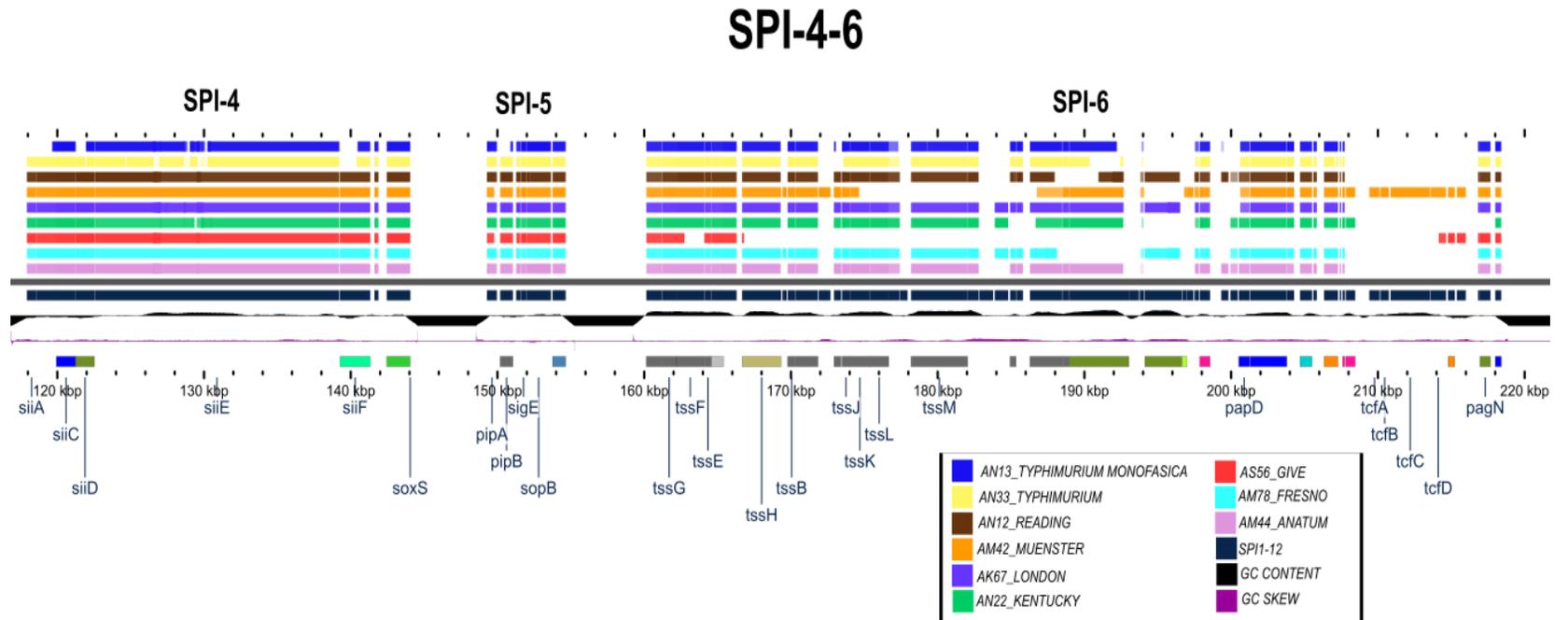


Figura 16. Atlas de BLAST de las SPI 4-6 de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino, mapa generado con el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

SPI-7

La SPI-7 es específica de *S. Typhi* y del serotipo Dublin, ya que codifica la síntesis de la cápsula (antígeno Vi), así como *sopE* (Sabbagh et al., 2010; Pickard et al., 2003). Por ello, los resultados obtenidos no causaron controversia, ya que ninguna de las cepas incluidas en el estudio presentó la isla, únicamente pudimos observar algunas coincidencias parciales de ésta con baja identidad.

SPI-8 y 9

Estas islas son las menos estudiadas y las más pequeñas (Figuroa and Verdugo, 2005). La SPI-8 no estuvo presente en ninguna cepa, al igual que la SPI-7 únicamente es posible observar ciertas coincidencias parciales. Mientras que la SPI-9 se observó en todos los aislamientos, pero debido a la falta de información sobre la isla, es difícil suponer el fenotipo que las cepas podrían desarrollar al encontrarse ésta.

Los resultados anteriormente descritos correspondientes a las SPI 7, 8 y 9, pueden observarse en la Figura 17.

SPI 7-9

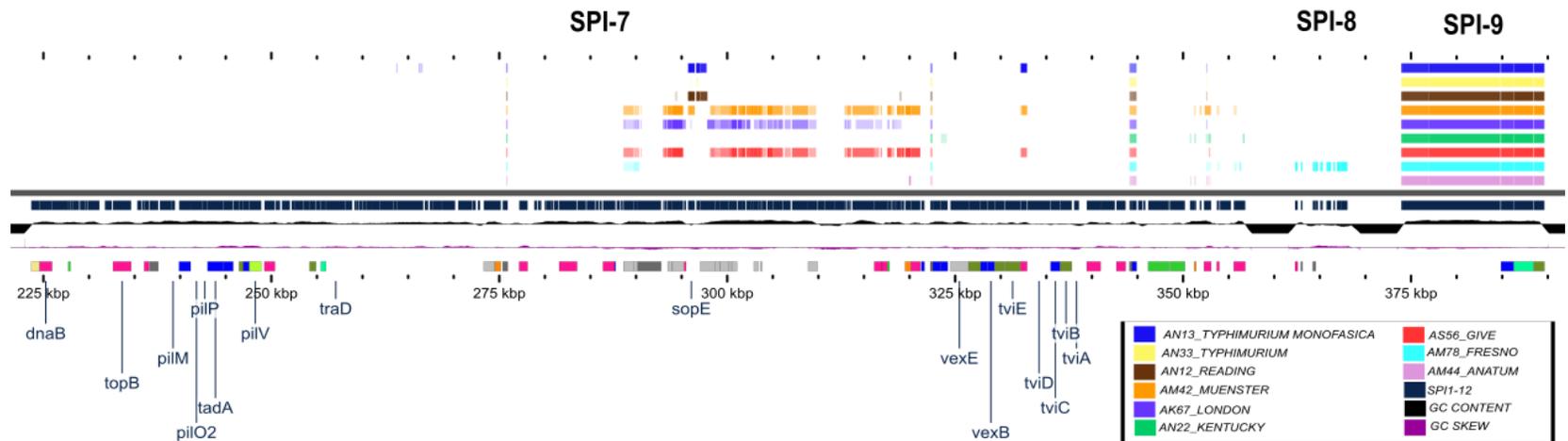


Figura 17. Atlas de BLAST de las SPI 7-9 de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino, mapa generado con el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

SPI-10, 11 y 12

Al igual que las dos islas anteriores, las SPI-10, 11 y 12 tampoco están totalmente estudiadas, pero se sabe que la característica más importante de la isla 10 es la presencia del operón fimbrial *sefABCDR* (Sabbagh et al., 2010; Figueroa and Verdugo, 2005). Como se puede observar en la Figura 18, ninguna de las cepas del estudio presentó la SPI-10; se ha reportado que la delección de esta isla en cepas de *S. Typhimurium* causa atenuación de la virulencia en ratones (Haneda et al., 2009). Mientras que en la SPI-11 se encuentran genes involucrados en la supervivencia intramacrófago, como *pagDC* (Sabbagh et al., 2010), la cual se presentó con muchas variaciones, ya que la mayoría de las cepas únicamente presentaron la mitad de la isla; mismo hecho que ocurrió con la SPI-12.

En general podemos concluir que las primeras cinco islas se encontraron altamente conservadas en las cepas del estudio, ya que la composición de aminoácidos en estas fue uniforme. Obtuvimos que las variaciones observadas en las cepas en las cinco primeras islas y las mejor caracterizadas, se vieron relacionadas entre los distintos serotipos que conformaron el estudio y no entre el tipo de muestra, es decir carne y linfonodos. Mientras que en la SPI-6, involucrada en la invasión tardía de las células hospederas, observamos que presentó una gran variación entre todos los serotipos, siendo Give el único que no presentó la isla ya que mostró solo pequeñas regiones parciales; además obtuvimos que las cepas provenientes de carne tenían mejor caracterización de esta isla. Por otro lado, las islas 7, 8 y 10 no se encontraron en ninguna de las cepas del estudio. Finalmente, las SPI 9, 11 y 12 se observaron conservadas en las cepas, pero debido a la falta de información del papel que éstas desarrollan las consecuencias de su presencia o ausencia son inciertas.

SPI 10-12

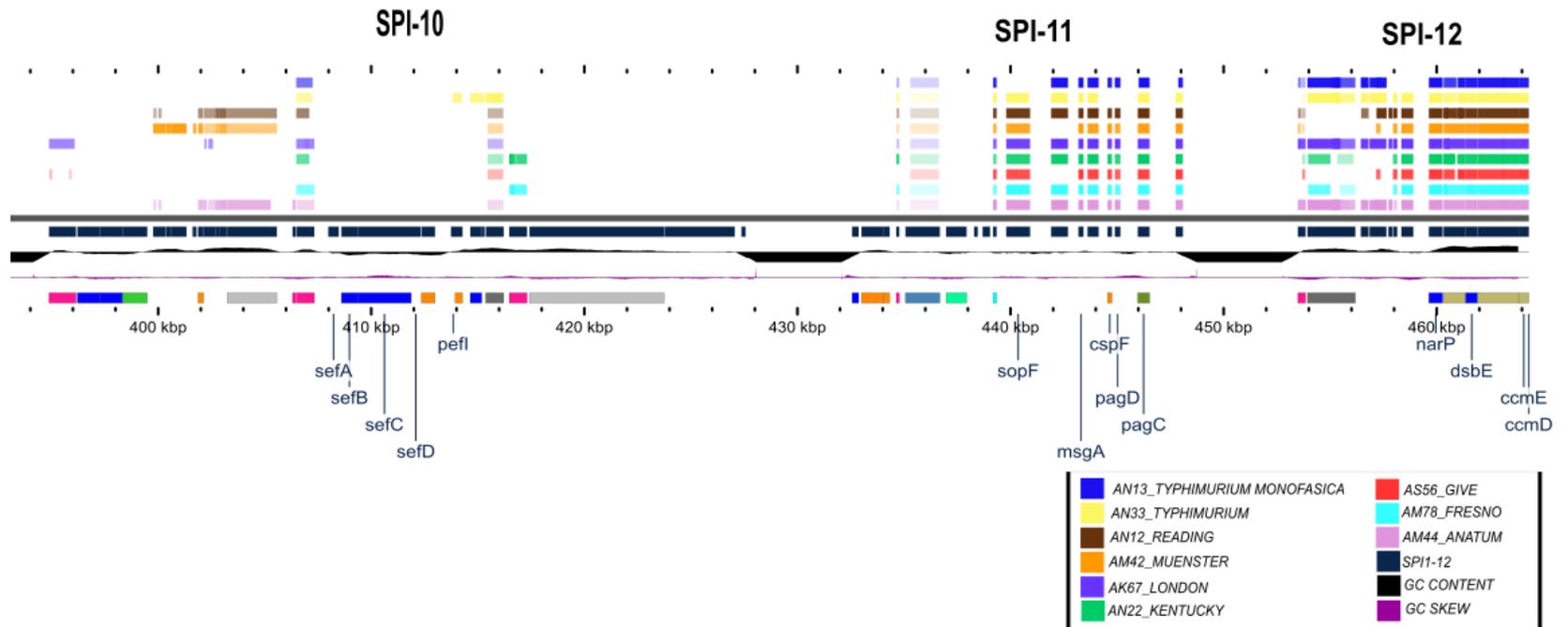


Figura 18. Atlas de BLAST de las SPI 10-12 de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino, mapa generado con el servidor Gview (Arndt et al., 2016).

2 Genómica comparativa de cepas de bovinos y casos clínicos

Con la finalidad de determinar las posibles similitudes existentes entre las cepas provenientes de carne molida y linfonodos con aislamientos recuperados de distintos casos clínicos humanos, se llevó a cabo una matriz de similitud calculando el coeficiente de correlación de Pearson.

Para ello, la primera matriz tuvo la finalidad de determinar si existe algún tipo de relación o no entre el tipo de muestra: linfonodos, carne y casos clínicos. En la Figura 19, podemos observar que todos los tipos de muestra están altamente relacionados, ya que todos presentaron valores cercanos a 1 con una significancia estadística de 0.05.

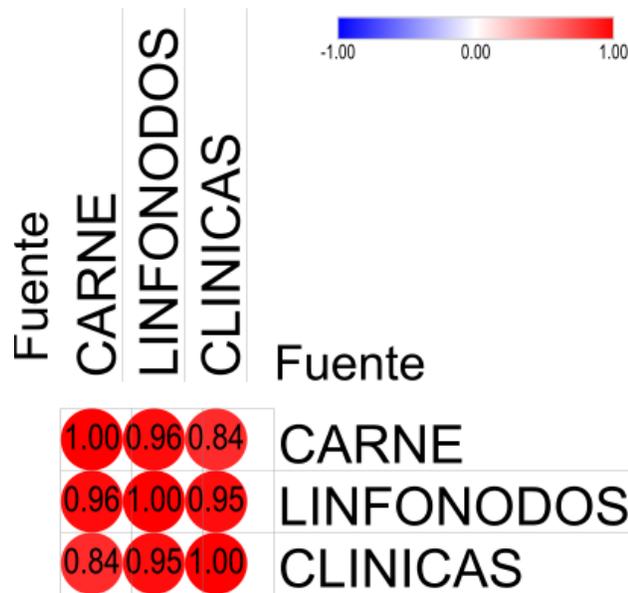


Figura 19. Matriz de BLAST por tipo de muestra de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino (provenientes de carne y linfonodos) y casos clínicos, generado en el servidor <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>

Además, se realizó una matriz de BLAST para determinar el grado de similitud en el proteoma de las cepas, según el serotipo y la fuente de aislamiento (Figura 20). En este, pudimos observar que la mayoría de las cepas tienen un perfil de virulencia muy similar, sin importar el serotipo o la fuente de la muestra, ya que mostraron coeficientes de correlación superiores a 0.70.

Las cepas de *S. Typhimurium* provenientes de bovinos fueron las que presentaron una menor correlación con el resto de los serotipos y fuentes ya que su mayor valor fue 0.6 con London, Fresno, Kentucky y Reading de bovino y Fresno de cepas clínicas. La menor correlación se encontró con un valor de -0.07 con Muenster de bovinos y 0.1 con Give de bovinos y Give, Muenster y Reading de cepas clínicas (estas tres últimas sin significancia estadística).

Mientras que, de las muestras clínicas, la cepa con menor coeficiente de correlación fue *S. Kentucky*, ya que fue la que presentó cuatro valores menores a 0.64, entre los que se encuentran *S. Give* y *Typhimurium* de bovinos, así como Give y Reading de casos clínicos.

Todas las cepas de un mismo serotipo evaluadas en este estudio presentaron una gran similitud, esto sin importar si provienen de casos clínicos o de linfonodos y carne molida. Lo cual es un hecho relevante, ya que evidencia la importancia de las cepas circulantes en el ganado bovino, que a pesar de no provocar sintomatología en los animales poseen un proteoma similar a aquellas involucradas en infecciones humanas.

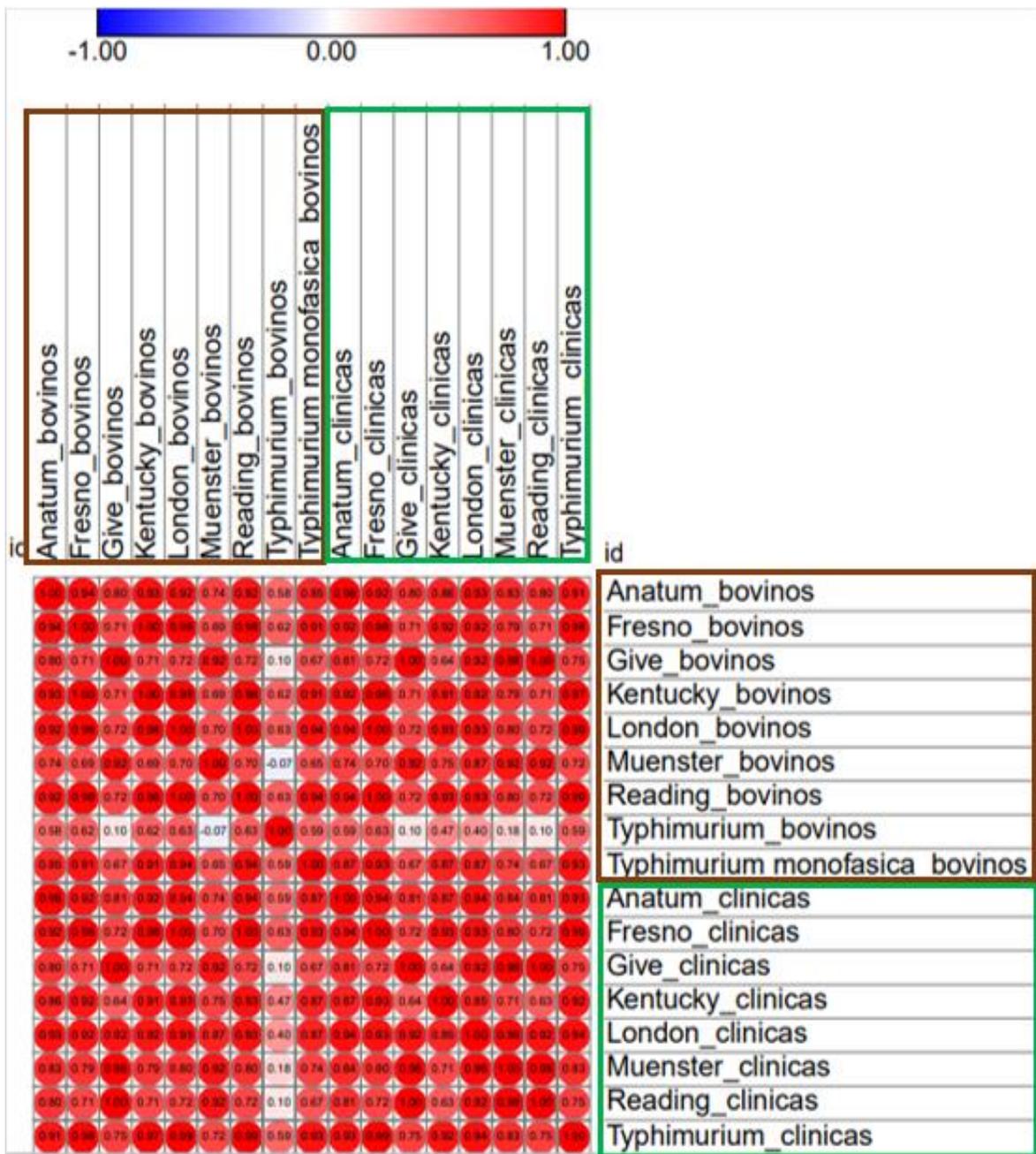


Figura 20. Matriz de BLAST por serotipo de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino y casos clínicos. En color verde se resaltan las cepas provenientes de casos clínicos, mientras que en color café se presentan las cepas provenientes de carne molida y linfonodos, generado en el servidor <https://software.broadinstitute.org/morpheus/>

CONCLUSIÓN

Este trabajo evidencia la alta conservación de genes de virulencia involucrados en el desarrollo de enfermedades sistémicas graves, infecciones subclínicas y de persistencia en el hospedero en cepas de *Salmonella* provenientes de linfonodos y carne molida de bovinos aparentemente sanos aprobados para la matanza, recalcando la importancia de estos como reservorios de *Salmonella*.

Otro hecho importante del estudio fue que logramos encontrar como parte del genoma de las cepas provenientes de carne molida y linfonodos genes como *lpfA*, *misL*, *siiE* y SPI-6, que le permiten a la bacteria permanecer en su hospedero durante periodos largos sin causar signos de enfermedad facilitando la diseminación de la bacteria. Además, la presencia de genes relacionados con la especificidad de hospederos, tal como la toxina tifoidea (*cdtB*, *ptIA*), podrían ser los causantes de la presencia en animales aparentemente sanos que al llegar al consumidor humano le permitan a la bacteria desarrollar el proceso infeccioso.

Por otro lado, la gran similitud que se observó entre las cepas de *Salmonella* provenientes de carne molida y linfonodos de bovino y cepas de casos clínicos recalcan el gran potencial patogénico y la importancia de ellas como posibles causantes de salmonelosis tanto en humanos como en animales. Los cuales podrían desarrollar infecciones sistémicas graves, debido a la presencia de genes relacionados con cepas hiper virulentas, tal como fue el caso del plásmido de virulencia presente en las cepas de *S. Typhimurium*.

Por ello, es importante la aplicación de buenas prácticas ganaderas y de manufactura, además de llevar a cabo un monitoreo más estricto en el control y detección del patógeno dentro de las granjas, establecimientos de matanza y durante el procesamiento de la canal, implementando medidas como la eliminación

de los nódulos linfáticos para la obtención de la carne molida con la finalidad de disminuir la presencia de la bacteria en alimentos destinados al consumo humano.

Referencias

1. Aguilar-Montes de Oca, Talavera-Rojas M, Soriano Vargas E, Barba-León J, Vázquez-Navarrete J, Acosta-Dibarrat J, Salgado-Miranda C. Phenotypic and genotypic profile of clinical and animal multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from Mexico. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 124: 67-74.
2. Althouse C, Patterson S, Fedorka-Cray P, Isaacson RE. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine in vivo. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (11): 6446-6452.
3. Amavisit P, Lightfoot D, Browning G F y Markham P F. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (12): 3624-3635.
4. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data, 2010. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
5. Barreto Marlen, Castillo-Ruiz Mario y Patricio Retamal. *Salmonella entérica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 2016, 33 (5): 547-557.
6. Bäumler A J, Tsolis R M, Heffron F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93 (1): 279-283.
7. Bäumler A J, Tsolis R M, Bowe F A, Kusters J G, Hoffmann S, Heffron F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infection and Immunity*. 1996, 64(1):61-68.

8. Besser John M. *Salmonella* epidemiology: a whirlwind of change. Food Microbiology, 2018, 71: 55-59.
9. Miljkovic-Selimovic Biljana, Babic Tatjana y Predrag Stojanovic. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis- Actualities and importance. Acta Medica Medianae, 2010, 49 (3): 71-75.
10. Blanc-Potard Anne-Béatrice, Solomon Felix, Kayser Jayson, Groisman Eduardo A. The SPI-3 Pathogenicity island of *Salmonella enterica*. Journal of Bacteriology, 1999, 181 (3): 998-1004.
11. Blaser Martin J, Kirschner Denise. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. Nature, 2007, 449: 843-849.
12. Blondel Carlos J, Jiménez Juan C, Contreras Inés, Santiviago Carlos A. Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. BMC Genomics, 2009, 10: 354, 1-17.
13. Bolger Anthony M, Lohse Marc y Usadel Bjoem. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 2014, 30 (15): 2114-2120.
14. Bou Germán. Relationship between resistance and virulence in bacteria of clinical interest. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2014, 31 (1): 1-3.
15. Brunet Yannick R, Khodr Ahmad, Logger Laureen, Aussel Laurent, Mignot Tâm, Sylvie Rimsky, Cascales Eric. H-NS silencing of the *Salmonella* Pathogenicity Island 6-encoded type VI secretion system limits *Salmonella enterica* serovar Typhimurium interbacterial killing. Infection and Immunity, 2015, 83 (7): 2738-2750.
16. Cabrera-Díaz Elisa, Barbosa-Cardenas Claudia M, Perez-Montaña Julia A, Gonzalez-Aguilar Delia, Pacheco-Gallardo Carlos, Barba Jeannette. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco state, Mexico. Journal of Food Protection, 2013, 76 (12): 2004-2010.

17. Cardona-Castro Nora, Restrepo-Pineda Eliana y Correa-Ochoa Margarita. Detection of *hilA* gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, 2002, 97 (8): 1153-1156.
18. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* and food (documento en internet) Septiembre, 2021. Consultado el 22 de diciembre de 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/communication/salmonella-food.html>
19. Chaudhuri Roy R, Morgan Eirwen, Peters Sarah E, Pleasance Stephen J, Hudson Debra L, Davies Holly M, Wang Jinhong, van Diemen Pauline M, Buckley Anthony M, Bowen Alison J, Pullinger Gillian D, Turner Daniel J, Langridge Gemma C, Turner A Keith, Parkhill Julian, Charles Ian G, Maskell Duncan J, Stevens Mark P. Comprehensive assignment of roles for *Salmonella* Typhimurium genes in intestinal colonization of food-producing animals. PLOS Genetics, 2013, 9 (4): 1-11.
20. Chishih Chu, Ye Feng, An-Chi Chien, Songnian Hu, Chi-Hong Chu y Cheng-Hsun Chiu. Evolution of genes on the *Salmonella* virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. Genomics, 2008, 92: 339-343.
21. Chu Chishih, Chiu Cheng-Hsun, Wu Wan-Yu, Chu Chi-Hong, Liu Tsui-Ping, Ou Jonathan T. Large drug resistance virulence plasmids of clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Cholerasuis. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2001, 45 (8):2299-2303.
22. Collinson S K, Clouthier S C, Doran J L, P A Banser, W W Kay. *Salmonella enteritidis agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. Journal of Bacteriology, 1996, 178 (3): 662-667.
23. Contreras-Soto M B, Medrano-Félix J A, Ibarra-Rodríguez J R, Martínez-Urtaza J, Chaidez Q C, Castro-del Campo N. Los últimos 50 años de *Salmonella* en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad. Revista Bio Ciencias, 2019, 6: 1-26.

24. Cornelius Poppe, Nonie Smart, Rasik Khakhria, Wendy Johnson, John Spika, John Prescott. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. *Canadian Veterinary Journal*, 1998, 39: 559-565.
25. Costa Sonia C P, Schmitz Alexa M, Jahufar Fathima F, Boyd Justin D, Cho Min Y, Glicksman Marcle A, Lesser Cammie F. A new means to identify type 3 secreted effectors: functionally interchangeable class IB chaperones recognize a conserved sequence. *American Society for Microbiology*, 2012, 3 (1): 1-10.
26. Costa Tiago R D, Felisberto-Rodrigues Catarina, Meir Amit, Prevost Marie S, Redzej Adam, Trokter Martina y Waksman Gabriel. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews*, 2015, 13: 343 – 359.
27. Crump John A. Progress in Typhoid fever epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 68 (S1): S4-9.
28. del Bel Belluz Lisa, Riccardo Guidi, Ioannis S Pateras, Laura Levi, Boris Mihaljevic, Syed Fazle Rou, Marie Wrande, Marco Candela, Silvia Turrone, Claudia Nastasi, Clarissa Consolandi, Clelia Peano, Toma Tebaldi, Gabriella Viero, Vassilis G Gorgoulis, Thorbjorn Krejsgaars, Mikael Rhen y Teresa Frisan. The Typhoid toxin promotes host survival and the establishment of a persistent asymptomatic infection. *Plos pathogens*, 2016.
29. De la Torre Martínez María Eugénia. Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, 2006.
30. De Toro María, Seral Cristina, Rojo-Bezares Beatriz, Torres Carmen, Castilo Javier F, Sáenz Yolanda. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella entérica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2014, 32 (1): 4-10.
31. Delgado Enrique. *Salmonella* spp detection and isolation. *Protocols.io*. Disponible en: <https://www.protocols.io/view/salmonella-spp-detection-and-isolation-bpybmpsn>

32. Delgado Suárez Enrique Jesús. Secuenciación completa del genoma de cepas de *Salmonella enterica* obtenidas en diferentes segmentos de la cadena productiva de bovinos de carne. (Tesis de Doctorado). FMVZ/UNAM, Ciudad de México, 2019.
33. Delgado-Suárez Enrique Jesús, Selem-Mojica Nelly, Ortiz-López Rocío, Gebreyes Wondwossen A, Allard Marc W, Barona-Gómez Francisco, Rubio-Lozano María Salud. Whole genome sequencing reveals widespread distribution of typhoidal toxin genes and VirB/D4 plasmids in bovine-associated nontyphoidal *Salmonella*. *Scientific Reports*, 2018, 8 (9864).
34. Den Bakker Henk C, Moreno Switt Andrea I, Govoni Gregory, Cummings Craig A, Ranieri Matthew L, Degoricija Lovorka, Hoelzer Karin, Rodriguez-Rivera Lorraine, Brown Stephanie, Bolchacova Elena, Furtado Manohar R, Wiedmann Martin. Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC Genomics*, 2011, 12: 425.
35. Dorsey C W, Laarakker M C, Humphries A D, Weening E H, Bäumlér A J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Molecular Microbiology* 2005, 57(1):196-211.
36. Duffy Lesley L, Dykes Gary A, Fegan Narelle. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia. *Food Research International*, 2012, 45: 770-779.
37. Edrington T S, Loneragan G H, Genovese K J, Hanson D L, Nisbet D J. *Salmonella* persistence within the peripheral lymph nodes of cattle following experimental inoculation. *Journal of Food Protection*, 2016, 79 (6): 1032-1035.
38. Eran Zeynep, Akcelik Mustafa, Cansu Yazici Betül, Özcengiz Gülay, Akcelik Nefise. Regulation of biofilm formation by *marT* in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47: 5041-5050.

39. Espinoza Rodrigo A, Silva-Valenzuela Cecilia A, Amaya Fernando A, Urrutia Italo M, Contreras Inés, Santiviago Carlos A. Differential roles for pathogenicity islands SPI-13 and SPI-8 in the interaction of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhi with murine and human macrophages. *Biological Research*, 2017, 50 (5).
40. Fardsanei Fatemeh, Mohammad Mehdi Soltan Dallal, Masoumeh Douraghi, Taghi Zahraei Salehi, Mahmood Mahmoodi, Hamed Memariani, Farhad Nikkihahi. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 451-456.
41. Ferguson Andrew D, Deisenhofer Johann. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 1565, 2002: 318-332.
42. Fischer Eckhard, Günter Karolin y Braun Volkmar. Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: Phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of TonB by ExbB. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171 (9): 5127-5134.
43. Figueroa Ochoa Inda Marcela, Verdugo Rodríguez Antonio. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2005, 47 (1-2): 25-42.
44. Folkesson Anders, Löfdahl Sven, Normark Staffan. The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Research in Microbiology*, 2002, 153: 537-545.
45. Gal-Mor Ohad; Boyle Erin C, Grassl Guntram A. Same Species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5, artículo 391: (1-10).
46. Gao Xiang, Deng Lingquan, Stack Gabrielle, Yu Hai, Chen Xi, Naito-Matsui Yuko, Varki Ajit, Galán Jorge E. Evolution of host adaptation in the *Salmonella*

typhoid toxin. *Nature Microbiology Letters*. 2017 Macmillan Publishers Limited, par of Springer Nature.

47. Gragg Sara E, Loneragan Guy H, Norasak Kalchayanand, Wheeler Tommy L, Wang Rong, Brashears Mindy M, Brown Tyson R, Schmidt John W, Terrance M Arthur, Brooks Chance J, Edrington Thomas S, Bosilevac Joseph M, Shackelfor Steven D, Brichta-Harhay Dayna M. Cross-sectional study examining *Salmonella enterica* carriage in subiliac lymph nodes of cull and feedlot cattle at harvest. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2013, 10 (4): 368-374.
48. Green Erin R, Meccas Joan. Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4 (1): 1-19.
49. Grimont Patrick A D, Weill Francois-Xavier. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (WHOCC-Salm), 9 edición, 2007.
50. Guo Aizhen, Lasaro Melissa A, Sirard Jean-Claude, Kraenenbühl Jean-Pierre y Schifferli Dieter M. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by dendritic cells. *Microbiology*, 2007, 153: 1059-1069.
51. Gupta Sushim K, Sharma Poonam, McMillan Elizabeth A, Jackson Charlene R, Hiott Lari M, Woodley Tiffanie, Humayoun Shaheen B, Barrett John B, Frye Jonathan G, McClelland Michael. Genomic comparison of the diverse *Salmonella* serovars isolated from swine. *PLoS one*, 2019, 14 (11) 1-24.
52. Gutiérrez-Cogco Lucina, Montiel-Vázquez Edith, González-Andrade María del Carmen. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Salud Pública de México*, 2000, 42 (6): 1-8.
53. Haghjoor Erik, Galán Jorge E. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *PNAS*, 2004, 101 (13): 4614 - 4619.
54. Hall Holly K, Foster John W. The Role of Fur in the Acid Tolerance Response of *Salmonella Typhimurium* is Physiologically and Genetically Separable from

- Its Role in Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178 (19): 5683-5691.
55. Hallstrom Kelly N, McCormick Beth A. Chapter 16- Pathogenicity Islands: origins, structure, and roles in bacterial pathogenesis, *Molecular Medical Microbiology*, 2da edición, 2015, 1: 303-314.
56. Hansmeier Nicole, Miskiewicz Katarzyna, Elpers Laura, Liss Viktoria, Hensel Michael, Sterzenbach Torsten. Functional expression of the entire adhesiome of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Nature, Scientific Reports*, 2017, 7: 10326.
57. Hensel Michael. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of medical Microbiology*, 2004, 294: 95-102.
58. Herrero-Fresno Ana, Wallrodt Inke, Leekitcharoenphon Pimlapas, Elmerdahl Olsen John, Aarestrup Frank M y Hendriksen Rene S. The role of the *st313-td* gene in virulence of *Salmonella* Typhimurium ST313. *PLoS ONE*, 2014, 9 (1): e84566 (1-11).
59. Hirose Kenji, Ezaki Takayuki, Miyake Masaki, Li Teimin, Abdul Quayum Khan, Kawamura Yoshiaki, Yokoyama Hideaki y Takami Tsuyoshi. Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella* Typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 147: 259-265.
60. Ibarra J. Antonio, Steele-Mortimer. *Salmonella*- the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology*, 2009, 11 (11): 1579-1586.
61. Ishmael Festus Jaja, Nolwazi Londiwe Bhembe, Ezekiel Green, James Oguttu, Voster Muchenje. Molecular characterisation of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from meat in South Africa. *Acta Tropica*, 2019, 190: 129-136.
62. Jacobsen Annika, Hendriksen Rene S, Aarestrup Frank M, Ussery David W, Friis Carsten. The *Salmonella enterica* Pan genome. *Microbial Ecology*, 2011, 62: 487-504.

63. Jones Timothy F, Ingram L Amanda, Cieslak Paul R, Vugia Duc J, Tobin-D'Angelo Melissa, Hurd Sharon, Medus Carlota, Cronquist Alicia, Angulo Frederick J. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *The Journal of Infectious Diseases*, 2008, 198: 109-114.
64. Jurado Jiménez R, Arenas Muñoz C, Doblaz Delgado A, Rivero A, Torre-Cisneros J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*, 2010, 10 (52): 3497-3501.
65. Kariuki Samuel, Gordon Melita A, Feasey Nicholas, Parry Christopher M. Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. *Vaccine*, 2015 (33): S21-S29.
66. Kingsley Robert A, Marijke Keestra A, De Zoete Marcel R, Bäumler Andreas J. The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin ¹³FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Molecular Microbiology*, 2004, 52 (2): 345-355.
67. Kingsley R A, Humphries A D, Weening E H, De Zoete M R, Winter S, Papaconstantinopoulou A, Dougan G, Bäumler A J. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infection and Immunity*, 2003, 71 (2): 629-640.
68. Kingsley Robert A, Santos Renato L, Marijke Keestra A, Garry Adams L and Bäumler Andreas J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (4): 895-905.
69. Koohmaraie Mohammad, Scanga John A, De la Zerda Michael J, Koohmaraie Bijan, Tapay Lourdes, Beskhlebnaya Vika, Mai Tam, Greeson Kay, Samadpour Mansour. Tracking the sources of *Salmonella* in ground beef produced from nonfed cattle. *Journal of Food Protection*, 2012, 8 (75): 1464-1468.

70. Kutsukake Kazuhiro, Yoshikazu Ohya, Shigeru Yamaguchi y Tetsuo Iino. Operon structure of flagellar genes in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Genetics and Genomics*, 1998, 214: 11-15.
71. Lan Ruiting, Reeves Peter R, Octavia Sophie. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infections, Genetics and Evolution*, 2009,9: 996-1005.
72. Langridge Gemma C, Fookes Maria, Connor Thomas R, Feltwell Theresa, Feasey Nicholas, Parsons Bryony N, Seth-Smith Helena M B, Barquist Lars, Stedman Anna, Humphrey Tom, Wigley Paul, Peters Sarah E, Maskell Duncan J, Corander Jukka, Chabalgoity Jose A, Barrow Paul, Parkhill Julian, Dougan Gordon, Thomson Nicholas R. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 2015, 112, 3: 863-868.
73. Leekitcharoenphon Pimlapas, Rene S Hendriksen, Simon Le Hello, François-Xavier Weill, Dorte Lau Baggesen, Se-Ran Jun, David W Ussery, Ole Lund, Derrick W Crook, Daniel J Wilson, Frank M Aarestrup. Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (8): 2516-2526.
74. Libby Stephen J, Adams L Garry, Ficht Thomas A, Allen Chris, Whitford Howard A, Buchmeier Nancy A, Bossie Stuart, Guiney Donald G. The *spv* genes on the *Salmonella* dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infection and Immunity*, 1997, 65 (5): 1786-1792.
75. Lin-Hui Su, Cheng-Hsun Chiu. *Salmonella*: Clinical Importance and Evolution of Nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, 2007, 30 (3): 210-218.
76. Maldonado Ruiz Lucia P. Virulotipificación de aislados de *Salmonella enterica* obtenidos de productos cárnicos y derivados lácteos provenientes

de Michoacán (Tesis de Maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2015.

77. Marcus Sandra L, Brumell John H, Pfeifer Cheryl G, Finlay B Brett. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and infection*, 2000, 2: 145-156.
78. Martínez Álvarez Noelia. Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica* (Tesis de doctorado). Universidad de Oviedo, 2007, 202 páginas.
79. Martínez-Chávez L, Cabrera-Díaz E, Pérez-Montaña J A, Garay-Martínez L E, Varela-Hernández J J, Castillo A, Lucia L, Ávila-Novoa M G, Cardona-López M A, Gutiérrez-González P, Martínez-González N E. Quantitative distribution of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 210: 149-155.
80. Miller Rachel A, Wiedmann Martin. The cytolethal distending toxin produced by nontyphoidal *Salmonella* serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi induces DNA damage in a manner similar that of serotype Typhi. *mBio*, 2016, 7 (6): e02109-16.
81. Morgan Eirwen, Alison J Bowen, Sanya C Cornell, Timothy S Wallis, Mark P Stevens. SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infection and Immunity*, 2007, 75 (3): 1524-1533.
82. Naughton Patrick J, Grant George, Bardocz Susan, Allen-Vercoe Emma, Woodward Martin J, Pusztai Arpad. Expression of type 1 fimbriae (SEF21) of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in the early colonisation of the rat intestine. *Journal of Medical Microbiology*, 2001, 50: 191-197.
83. Nayarit-Ballesteros N., Rubio-Lozano María Salud, Delgado-Suárez Enrique, Méndez-Medina Danilo, Braña-Varela Diego, Rodas-Suárez Oscar. Perfil de resistencia a antibióticos de serotipos de *Salmonella* spp aislados de carne

- de res molida en la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 2016, 58 (3): 371-377.
84. Nickelson Kathryn J, Taylor Matthew T, Griffin Davey B, Savell Jeffrey W, Gehring Kerri B, Arnold Ashley N. Assessment of *Salmonella* prevalence in lymph nodes of U. S. and Mexican cattle presented for slaughter in Texas. *Journal of Food Protection*, 2019, 82 (2): 310-315.
85. Olafson Pia Untalan, Brown Tyson R, Lohmeyer Kimberly H, Harvey Roger B, Nisbet David J, Loneragan Guy H, Edrington Thomas S. Assessing transmission of *Salmonella* to bovine peripheral lymph nodes upon horn fly feeding. *Journal of Food Protection*, 2016, 79 (7): 1135-1142.
86. Organización Mundial de la Salud. Inocuidad de los alimentos. (documento en internet) OMS, última actualización 31 de octubre de 2017. (Consultado 22 de diciembre de 2019). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
87. Overbeek Ross, Olson Robert, Pusch Gordon D, Olsen Gary J, Davis James J, Disz Terry, Edwards Robert A, Gerdes Svetlana, Parrello Bruce, Shukla Maulik, Vonstein Veronika, Wattam Alice R, Fangfang Xia, Stevens Rick. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: D206-D214.
88. Palós Gutiérrez Tania B. Caracterización fenotípica y genotípica del perfil de resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* asociadas con ganado bovino de engorda (Tesis de Maestría). UNAM/FMVZ, Ciudad de México, 2021.
89. Perez-Montaña Julia A, Gonzalez-Aguilar Delia, Barba Jeannette, Pacheco-Gallardo Carlos, Campos-Bravo Carlos A, Garcia Santos, Heredia Norma L, Cabrera-Diaz Elisa. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico-*Journal of Food Protection*, 2012 75 (5): 867-873.
90. Petkau Aaron, Stuart-Edwards Matthew, Stothard Paul. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics*, 2010, 26: 3125-3126.

91. Pickard Derek, Wain John, Baker Stephen, Line Alexandra, Chohan Sonia, Fookes Maria, Barron Andrew, Gaora Peadar Ó, Chabalgoity José A, Thanky Niren, Scholes Christoph, Thomson Nicholas, Quail Michael, Parkhill Julian, Dougan Gordon. Composition, acquisition and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* Pathogenicity Island SPI-7. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (17): 5055-5065.
92. Popoff Michel Y, Bockemühl Jochen, Brenner Frances W, Gheesling Linda L. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiology*, 2002, 152: 907-909.
93. Rabsch Wolfgang, Voigt Wolfgang, Reissbrodt Rolf, Tsolis Renée M, Bäumler Andreas J. *Salmonella typhimurium* IroN and FepA Proteins Mediate Uptake of Enterobactin but Differ in Their Specificity for Other Siderophores. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (11): 3610-3612.
94. Raffatellu Manuela, Chessa Daniela, Paul Wilson R, Tükel Cagla, Mustafa Akcelik, Bäumler Andreas J. Capsule-mediated immune evasion: a new hypothesis explaining aspects of Typhoid Fever pathogenesis. *Infection and Immunity*, 2006, 74 (1): 19-27.
95. Rahn K, De Grandis S A, Clarke R C, McEwen S A, Galán J E, Ginocchio C, Curtiss III R y Gyles C L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6: 271-279.
96. Realpe-Quintero Mauricio, Barba-León Jeannette, Pérez-Montaña Julia A, Pacheco-Gallardo Carlos, González-Aguilar Delia, Dominguez-Arias Rosa M, Cabrera-Díaz Elisa. Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *Peer J*, 2018, J 6:e5482; DOI 10.7717/peerj.5482
97. Richter-Dahlfors Agneta, Buchan Alison M. J. Murine Salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella* Typhimurium resides intracellularly

inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 186 (4): 569-580.

98. Rodriguez-Rivera Lorraine D, Bowen Barbara M, den Bakker Henk C, Duhamel Gerald E, Wiedmann Martin. Characterization of the cytolethal distending toxin (typhoid toxin) in non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Gut Pathogens*, 2015, 7:19.
99. Rosselin Manon, Virlogeux-Payant Isabelle, Roy Christian, Bottreau Elisabeth, Sizaret Pierre-Yves, Mijouin Lily, Germon Pierre, Caron Emmanuelle, Velge Philippe and Wiedemann Agnès. Rck of *Salmonella enterica*, subspecies *enterica* serovar Enteritidis, mediates zipper-like internalization. *Cell Research*, 2010, 20: 647-664.
100. Rubio Lozano Maria Salud, Martínez Bruno José Fernando, Hernández Castro Rigoberto, Bonilla Contreras Cynthia, Méndez Medina Rubén Danilo, Núñez Espinosa José Fernando, Echeverry Alejandro, Brashears Mindy M. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2013, 4 (1): 107-115.
101. Rychlik Ian, Barrow Paul A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonization and infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29: 1021-1040.
102. Sabbagh Sébastien C, Forest Chantal G, Lepage Christine, Leclerc Jean-Mathieu, Daigle France. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 305: 1-13.
103. Salvagni Castilla Karina; Claudete Serrano Astolfi Ferreira; Andrea Micke Moreno; Iolanda Aparecida Nunes; Antônio José Piantino Ferreira. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains isolated in Brazil. *Journal of Microbiology*, 37, 2006, páginas 135-139.

104. Secretaría de Salud. Anuarios de morbilidad. Secretaria de Salud, México, 1984-2020. Disponible en: <https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/index.html> Citado: 22 de marzo de 2022.
105. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. 2014, México: Diario Oficial de la Federación, 3 de octubre 2014.
106. Steele-Mortimer Olivia, Brumell John H, Knodler Leigh A, Méresse Stephane, Lopez Ana, Finlay Brett. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. Cellular Microbiology, 2002, 4 (1): 43-54.
107. Silva Claudia, Puente José Luis y Calva Edmundo. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. Pathogens and Disease, 2017, 75 (6).
108. Silva Gabriela, López Héctor S. Genes involved pathogenesis, persistence, excretion of *Salmonella* in animals models. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 2012, 2 (1225): 107-122.
109. Shu-Kee Eng, Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in live science, 2015, vol. 8, no.3, páginas 284-293.
110. Tack Danielle M, Ray Logan, Griffin Patricia M, Cieslak Paul R, Dunn John, Rissman Tamara, Jervis Rachel, Lathrop Sarah, Muse Alison, Duwell Monique, Smith Kirk, Tobin-D'Angelo Melissa, Vugia Duc J, Zablotsky Kufel Joanna, Wolpert Beverly J, Tauxe Robert, Payne Daniel C. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S.

- Sites, 2016-2019. US Department of Health and Human Services/Centers for Disease Control and Prevention, 2020, 69 (17): 509-514.
111. Tsolis Renée M, Garry Adams L, Hantman Michael J, Scherer Christina A, Kimbrough Tyler, Kingsley Robert A, Ficht Thomas A, Miller Samuel I, Bäumlér Andreas J. SspA is required for lethal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infections in calves but is not essential for diarrhea. *Infection and Immunity*, 2000, 68 (6): 3158 – 3163.
 112. Tünde Kiss, Eirwen Morgan y Gabor Nagy. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 275: 153-159.
 113. Visca P, Filetici E, Anastasio M P, Vetriani C, Fantasia M, Orsi N. Siderophore production by *Salmonella* species isolated from different sources. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, 79: 225-232.
 114. Vivek Bajaj, Clara Hwang y Catherine A Lee. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella* Typhimurium invasion genes. *Molecular Microbiology*, 1995, 18 (4): 715-727.
 115. Voth Daniel E, Broederdorf Laura J, Graham Joseph G. Bacterial type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Microbiology*, 2012, 7 (2): 241-257.
 116. Wingstrand, S Aabo. *Salmonella* spp. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 2014, 2: 367-375.
 117. Yoshida Catherine E, Kruczkiewicz Peter, Laing Chad R, Lingohr Erika J, Gannon Victor P J, Nash John H E, Taboada Eduardo N. The *Salmonella* in silico typing resource (SISTR): an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft *Salmonella* genome assemblies. *PLoS ONE*, 2016, 11 (1).
 118. Zaidi Mussaret B, López Macías Constantino, Calva Edmundo. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 2006, 48 (2): 121-125.

119. Zhigang Tan, Samuel M. Chekabab, Hai Yu, Xianhua Yin, Moussa S Diarra, Chengbo Yang, Joshua Gong. Growth and virulence of *Salmonella* Typhimurium mutants deficient in iron uptake. *ACS Omega*, 2019, 4: 13218-13230.
120. Zhou Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Khaled Mohamed, Yulei Fan, the Agama Study Group and Mark Achtman. The EnteroBase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Research*, 2020, 30: 130-152.