



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ANÁLISIS INTEGRAL DE LA CAPACIDAD DE VIRULENCIA
DE *Salmonella* Oranienburg DE ORIGEN CLÍNICO Y
AMBIENTAL**

Por:

I.B.Q. Edén Salenko Guerrero Soto

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del I.B.Q. Edén Salenko Guerrero Soto, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Nohelia Castro del Campo
Directora de tesis



Dra. Hilda Karina Ramírez Medina
Co-directora de tesis

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

Dr. Osvaldo López Cuevas
Secretario del comité de tesis

JOSE A. MEDRANO

Dr. José Andrés Medrano Félix
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Análisis Integral de la Capacidad de Virulencia de *Salmonella* Oranienburg de Origen Clínico y Ambiental” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edén Salenko Guerrero Soto, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD), Coordinación Culiacán, por abrirme las puertas desde el programa de inicio a la investigación, servicio social, prácticas profesionales y posteriormente como miembro del programa de Maestría en Ciencias.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), por su apoyo al brindarme sus instalaciones y equipo científico para llevar a cabo este proyecto de investigación. A mi directora de tesis, Dra. Nohelia Castro del Campo, por confiar en mí y aceptar ser mi directora de tesis y guía científica en más de una vez, compartiendo conocimiento, tiempo y apoyo en cada etapa, así como paciencia ante las adversidades. Le agradezco la amistad cultivada y aprecio siempre el trato cordial con la que se dirige, un buen ejemplo a seguir.

A la Dra. Hilda Karina Ramírez Medina, por ser mi co-directora, brindarme su tiempo y espacio para el desarrollo del proyecto de investigación. También por compartirme parte de sus conocimientos científicos para pulir las bases de esta investigación.

Al Dr. José Andrés Medrano Félix, por formar parte de mi comité de tesis y asistirme en dudas técnico-científicas que se presentaran y compartir sus conocimientos y perspectivas del mundo de la investigación, que ayudan a formarse como científico.

Al Dr. Osvaldo López Cuevas, por ser parte de mi comité de tesis y brindarme su tiempo y conocimiento con paciencia, que sirvieron para detallar este proyecto. Así como las ganas de transmitir el conocimiento a otras personas.

Al equipo técnico que conforma el LANIIA: QFB. Célida Martínez Rodríguez, por sus conocimientos técnicos y asistencia en el laboratorio para llevar a cabo los experimentos necesarios en tiempo y forma. A QFB. Miriam Belén Vega Rodríguez, por el apoyo técnico para resolver dudas que surgieran en el laboratorio.

Al grupo de investigadores que conforman el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos, en conjunto con LANIIA (LMAA-LANIIA), al Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz por estar pendiente y ofrecerme ayuda para llevar a cabo esta investigación, así como a la Dra. Nohelia Castro del Campo, al Dr. José Andrés Medrano Félix, al Dr. Osvaldo López Cuevas y al Dr. José

Benigno Valdez Torres, por aportar conocimiento valioso tanto al proyecto como a mi formación de estudiante de maestría.

A la planta docente que compartió su tiempo y conocimiento, como parte de la formación de estudiantes que agrega valor al programa de posgrados.

A los diferentes laboratorios que apoyaron y formaron parte de esta etapa, ya sea por su aporte técnico o del mismo personal con su saber: al Laboratorio de Agricultura Protegida y Poscosecha, a cargo del MC. Manuel Báez Sañudo y como técnico a la I.B. Rosalba Contreras M. que me abrieron su laboratorio, el primero en el que me pude desempeñar, en este caso en el programa de inicio a la investigación. Al Laboratorio de Fitopatología y su personal, Dr. Raymundo Saúl García Estrada, a los técnicos Ing. Luis Alfredo Osuna García, M.C. Isidro Márquez Zequera y a la Dra. Isabel Cruz Lachica por abrirme las puertas de su laboratorio en casos de requerir instrumentos para la elaboración del proyecto.

A mis compañeros pertenecientes al LMAA-LANIIA, María Belia Contreras Soto, Eduardo Heriberto, Irvin González, Marco Antonio, Juan Carlos, Arlet, Elizabeth, Aramis, Daniel Lira, Jean Pierre González, Berenice González, Mónica Coronado, Alondra Acosta, Karla Sandoval, Kimberly Hernández, Edgar Reza, José Aguirre, Cecilia Sánchez, Hillary Beltrán, Brian Estebanes, Karla Meza, Cynthia, Vianey Verdugo, y algunos más que pasaron o siguen perteneciendo al grupo, y algunos que fueron mis compañeros de generación también, pero que de cada uno he aprendido. A mis compañeros de generación de maestría, Rosalía, Alicia, Estefanía, Yazmin, Ángel, Manuel, Rigoberto, Lennin, Grecia, Luis, Alsino, Ricardo, Dulce, Alejandra, Iliana, por su compañerismo, ayuda y amistad brindada durante esta etapa de aprendizaje.

A todo el equipo administrativo, de mantenimiento y demás que conforman a CIAD Culiacán, que a parte de los docentes, investigadores, técnicos y estudiantes forman parte importante de este centro de investigación y son parte de esto.

A mi novia, que ha estado en todos los momentos de esta etapa importante, aprendimos y nos desarrollamos intelectual y personalmente juntos. Ha sido mi compañera y un apoyo clave, del que estoy muy orgulloso.

DEDICATORIA

A mis padres, que me han enseñado con el ejemplo a seguirme preparando y trabajar duro para obtener lo que uno quiere. Les agradezco lo que me han enseñado y su apoyo incondicional que me han servido para seguir desarrollándome en lo académico y personal.

A mis hermanos, que me impulsan y han sido también parte de mi ejemplo a seguir. Les doy las gracias por ser parte de esto.

¡GRACIAS!

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1. Generalidades de <i>Salmonella</i>	16
2.2. <i>Salmonella</i> en el Ambiente.....	17
2.3. Epidemiología.....	20
2.4. Patogenicidad	21
2.4.1. Islas de Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	24
2.4.2. Profagos	27
2.4.3. Plásmidos	28
2.4.4. Resistencia Antimicrobiana	30
2.5. Formación de Biopelículas	31
2.6. <i>Salmonella</i> Oranienburg	35
3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	39
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General.....	40
4.2. Objetivos Específicos	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Reactivación Bacteriana	41
5.2. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana	41
5.3. Extracción de ADN	43
5.4. Ensamble de Genomas.....	43
5.5. Anotación de Genomas y Genoserotipificación	44
5.6. Identificación de Genes Específicos e Islas de Patogenicidad	44
5.7. Determinación de Genes Únicos	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1. Perfil de Resistencia a Antimicrobianos.....	47
6.2. Secuenciación, Anotación y Genoserotipificación de los Genomas	51
6.2.1. <i>S. Oranienburg</i> S-76.....	51

CONTENIDO (continuación)

6.2.2. <i>S. Oranienburg</i> S-347.....	53
6.2.3. Genoserotipificación.....	54
6.3. Identificación de Genes Específicos y Relacionados a la Presencia de Plásmidos Presentes en los Genomas de <i>Salmonella</i>	54
6.3.1. Genes Relacionados con la Resistencia a Antimicrobianos	54
6.3.2. Identificación de Plásmidos	57
6.3.3. Genes Relacionados con la Formación de Biopelículas	57
6.4. Identificación de Factores de Virulencia Presentes en los Genomas de <i>Salmonella</i>	58
6.5. Determinación de Genes Únicos	62
7. CONCLUSIONES	65
8. RECOMENDACIONES	66
9. REFERENCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida activo entre ambiente hospedero y no hospedero de <i>Salmonella</i> (Winfield y Groisman, 2003).	18
2. Curso de la infección por <i>Salmonella</i> dentro del intestino y los factores de virulencia que lo conducen (Ilyas y colaboradores 2017).	23
3. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para S-76, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ceftriaxona, (2) cefepime, (3) ciprofloxacino y (4) ertapenem.	49
4. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para S-347, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ertapenem, (2) cefepime, (3) ceftriaxona y (4) ciprofloxacino.	50
5. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para ST14028s, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ertapenem, (2) ceftriaxona, (3) ciprofloxacino y (4) cefepime.	50
6. Contenido genético de S-76 agrupado en subsistemas por RAST.	52
7. Contenido genético de S-347 agrupado en subsistemas por RAST.	53
8. Genomas de S-76 y S-347 alineados con ST14028s como referencia, remarcando la localización de las SPIs y el plásmido con el que este último cuenta.	60
9. Diagrama de Venn con el contenido genético de S-76 y S-347. Los espacios exclusivos representan los genes únicos de un solo genoma (color azul para S-76 y color rojo para S-347). El espacio con intersección representa los genes compartidos o en común entre los dos genomas.	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación taxonómica de los serotipos de Salmonella.....	16
2. Antimicrobianos utilizados en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana categorizados por clase, contenido y categorías de susceptibilidad para cada uno.....	42
3. Base de datos con número de secuencias contenidas en cada una, utilizadas en la búsqueda de genes AMR, mutaciones puntuales en cromosoma, genes de virulencia y replicones de plásmidos presentes en los genomas S-76 y S-347.....	45
4. Contenido de la base de datos utilizada para la construcción de las SPIs de S-76 y S-347.....	46
5. Promedio de las mediciones de halos de inhibición para S-76, S-347 y ST14028s en la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos.....	47
6. Información genética de la secuenciación de las cepas de S-347 y S-76.	53
7. Información obtenida de la genoserotipificación in silico con la plataforma SISTR.....	54
8. Homología de genes relacionados con resistencia a antimicrobianos presentes en los genomas de las cepas S-76 y S-347 comparados con los genes de ST14028s.	55
9. Mutación cromosómica relacionada con resistencia a antimicrobianos encontrada en el genoma de S-76 y de S-347.....	57
10. Principales factores de virulencia presentes en los genomas de S-76, S-347 y ST14028s.....	59
11. Identificación de SPIs en los genomas de S. Oranienburg S-76 y S-347.	61

RESUMEN

Salmonella es uno de los principales agentes infecciosos que causan enfermedades diarreicas a nivel mundial vinculado al consumo de alimentos contaminados. Dentro de los vehículos de contaminación por *Salmonella* se encuentran los cuerpos de agua; este ambiente expone a *Salmonella* a condiciones de estrés (temperatura, radiación solar, salinidad, depredación y agentes químicos) que repercuten en la capacidad de crecimiento, supervivencia, virulencia y resistencia a antimicrobianos (AMR) de la bacteria. En Sinaloa, *Salmonella* Oranienburg es uno de los serotipos mayormente encontrados en matrices ambientales y las investigaciones realizadas se han centrado en determinar la capacidad de infección y producción de biopelículas de *S.* Oranienburg de origen ambiental y clínico. Sin embargo, se desconoce su perfil AMR y es necesario estudiar con mayor profundidad sus características genéticas para conocer el potencial de patogenicidad y AMR, dependiendo de su fuente de aislamiento. El objetivo del presente proyecto fue determinar el perfil fenotípico de AMR y caracterizar genotípicamente la capacidad patogénica de *Salmonella* Oranienburg de origen clínico (S-347) y ambiental (S-76). La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer y 22 antibióticos de diez clases diferentes. Se secuenció la cepa S-347 y se anotaron los genomas de S-347 y S-76 mediante los programas RAST y Prokka para determinar el perfil genómico. Se identificaron los genes específicos para AMR utilizando los programas ABRicate y ResFinder, los genes para formación de biopelícula mediante RAST y Prokka, y las islas de patogenicidad con la herramienta NCBI-BLASTn. Se determinaron los genes únicos con el programa Roary, a fin de encontrar diferencias intraserotipo. Los resultados de AMR en laboratorio mostraron que las cepas S-76 y S-347 fueron susceptibles a los 22 antibióticos evaluados. La longitud del genoma de S-347 (5.0 Mpb) fue 9 % mayor que S-76 (4.6 Mpb), dotándola de más secuencias codificantes (CDS): 5,087 CDS para S-347 y 4,498 CDS para S-76. Se obtuvo el mismo número de genes relacionados con virulencia, defensa y producción de biopelícula (108 genes) en los genomas de S-347 y S-76. Ambos genomas presentaron 8 genes codificantes para bombas de eflujo relacionados con AMR, a excepción del gen *mdtA* ausente en S-347. Se identificaron las islas de patogenicidad 1-3, 5, 6, 9 y 11 en ambas cepas de *S.* Oranienburg, y las islas 4 y 12 solamente en S-76, estas últimas relacionadas con la supervivencia en macrófagos y en el huésped.

Palabras clave: *Salmonella* Oranienburg, virulencia, susceptibilidad antimicrobiana, biopelícula, islas de patogenicidad, análisis bioinformático.

ABSTRACT

Salmonella is one of the main infectious diarrheal causing agents worldwide linked to the consumption of contaminated food. Within the vehicles of contamination by *Salmonella* are the bodies of water; these environments expose *Salmonella* to stress conditions (temperature, solar radiation, salinity, predation, and chemical agents) that affect the growth capacity, survival, virulence, and antimicrobial resistance (AMR) of the bacteria. In Sinaloa, *Salmonella* Oranienburg is one of the serotypes mostly found in environmental matrices and the studies have mainly focused on determining the infection and biofilm production capacity of *S. Oranienburg* of environmental and clinical origin. However, its AMR profile is unknown, and it is necessary to study its genetic characteristics in greater depth to know the potential for pathogenicity and AMR, depending on its source of isolation. The objective of this project was to determine the phenotypic profile of AMR and to characterize genotypically the pathogenic capacity of *S. Oranienburg* of clinical (S-347) and environmental (S-76) origin. The antimicrobial susceptibility test was performed using the Kirby-Bauer disk diffusion method and 22 antibiotics from ten different classes. The S-347 strain was sequenced and the S-347 and S-76 genomes were annotated using RAST and Prokka programs to determine the genomic profile. Specific genes for AMR were identified using the ABRicate and ResFinder programs, genes for biofilm formation using RAST and Prokka, and the pathogenicity islands with the NCBI-BLASTn tool. Unique genes were determined with the Roary program, to find intra-serotype differences. The AMR results in the laboratory showed that the S-76 and S-347 strains were susceptible to the 22 antibiotics evaluated. The genome length of S-347 (5.0 Mbp) was 9 % greater than S-76 (4.6 Mbp), providing it with more coding sequences (CDS): 5,087 CDS for S-347 and 4,498 CDS for S-76. The same number of genes related to virulence, defense, and biofilm production (108 genes) were obtained in the S-347 and S-76 genomes. Both genomes had eight genes coding for AMR-related flux pumps, except for the *mdtA* gene absent in S-347. Pathogenicity islands 1-3, 5, 6, 9, and 11 were identified in both strains of *S. Oranienburg*, and islands 4 and 12 only in S-76, the latter related to macrophage and host survival.

Keywords: *Salmonella* Oranienburg, environmental and clinical origin, virulence, antimicrobial susceptibility, biofilm, pathogenicity islands, bioinformatic analysis.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria que se transmite comúnmente por consumir agua y alimentos contaminados. La evolución y el posible desarrollo de complicaciones al contraer el microorganismo y desarrollar salmonelosis, recae en el estado de salud de la persona contagiada y del serotipo de *Salmonella* (OMS, 2018). A pesar de que *Salmonella* se asocia principalmente con el consumo de alimentos contaminados, derivado de procesos insalubres de producción primaria, distribución y preparación de los mismos (Gomez y colaboradores 1997), existen reportes en los que se ha confirmado a las fuentes ambientales como uno de los orígenes de la contaminación (CDC, 2002). A *Salmonella* se le ha atribuido una naturaleza ubicua en cuerpos de agua dulce y marina, sugiriendo que la transmisión por el consumo de agua, o de alimentos que han tenido contacto con ésta, es altamente probable (Martínez-Urtaza y colaboradores 2004).

Las condiciones ambientales en los cuerpos de agua cambian con frecuencia, lo cual puede generar baja disponibilidad de nutrientes, estrés osmótico, variaciones de pH, temperatura, radiación ultravioleta, agentes tóxicos y depredación, convirtiéndolos en factores estresantes para *Salmonella* al estar fuera del hospedero (Martínez-Urtaza y colaboradores 2004; Winfield y Groisman, 2003). La respuesta del microorganismo ante estas condiciones, podría impactar no solo en su crecimiento y supervivencia, sino también en su virulencia y resistencia a múltiples antimicrobianos, favoreciendo que continúe con su ciclo de vida (Spector y Kenyon, 2012). Para sobrevivir a los ambientes externos y dentro de un hospedero, *Salmonella* ha desarrollado diversos mecanismos genéticos y fisiológicos, dentro de los cuales está la formación de biopelículas, que provee una protección ante los factores ambientales mencionados anteriormente, resistencia al sistema inmune del hospedero, resistencia ante moléculas tóxicas como los antibióticos y desinfectantes, promueve la cooperación metabólica y un intercambio de ADN más eficiente de la comunidad microbiana contenida en la biopelícula (Steenackers y colaboradores 2012; Stewart y Costerton, 2001).

El proceso infeccioso de *Salmonella* inicia cuando ésta llega a un hospedero y desencadena varias etapas, que comienza con su adhesión al epitelio intestinal, seguido de invasión celular, supervivencia intracelular y daño celular; cualquiera de estas etapas puede verse afectada o interrumpida por factores estresantes presentes en el ambiente de donde proviene la bacteria (Spector y Kenyon, 2012). Andino y Hanning (2015), describieron a los serotipos de *Salmonella*

como microorganismos resistentes a diferentes condiciones ambientales, con un sistema genómico complejo que necesita mayor estudio para comprender las diferencias con base en reservorios específicos y patogénesis que tienen algunos serovares de *Salmonella*, así como la dependencia de serotipo al estrés ambiental.

Salmonella Oranienburg ha estado relacionada con brotes de infección transmitidos por alimentos a nivel mundial y nacional (CDC, 2016; Hedberg y colaboradores 1992; Vázquez-Garcidueñas y colaboradores 2014; Werber y colaboradores 2005). En América del Norte y América Latina, el serotipo Oranienburg ocupa el 10mo y 15vo lugar, respectivamente, entre los serotipos aislados de humanos enfermos por el consumo de alimentos contaminados (Hendriksen y colaboradores 2011). En México se han reportado al menos 216 serotipos de *Salmonella* de diferentes orígenes de aislamiento, dentro de los que se encuentra *S.* Oranienburg como uno de los 10 serotipos con mayor prevalencia en este país (Contreras-Soto y colaboradores 2019). En Sinaloa, se ha reportado una prevalencia de *Salmonella* en más del 80 % de las muestras de agua de ríos, resaltando el serotipo Oranienburg como uno de los mayormente encontrados (Estrada-Acosta y colaboradores 2014; Jiménez y colaboradores 2014; López-Cuevas y colaboradores 2009).

Las investigaciones realizadas en la región, se han centrado en el aislamiento de *Salmonella* (Jiménez y colaboradores 2014), la evaluación de su capacidad infecciosa (Ramírez y colaboradores 2018) y la capacidad de producción de biopelículas de *Salmonella* Oranienburg de origen ambiental y clínico (Contreras-Soto y colaboradores 2021). Sin embargo, su perfil de resistencia a antimicrobianos se desconoce y su perfil de resistencia genómico necesita mayor estudio. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue analizar e integrar las características genotípicas y fenotípicas involucradas en la patogenicidad de *Salmonella* Oranienburg de origen clínico y ambiental, con el fin de conocer las diferencias en torno a la capacidad patogénica y resistencia antimicrobiana de estas cepas, dependiendo de su fuente de aislamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de *Salmonella*

Salmonella es un género bacteriano que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, perfil de tinción Gram negativo y con forma bacilar (Brenner, 1984; Coburn y colaboradores 2007). El nombre de esta familia está dado por la localización donde se encuentran habitualmente, fungiendo como saprófitos en el tubo digestivo de animales y humanos, aunque, consecuentemente también se pueden aislar de forma usual en un ambiente externo al tracto digestivo, como el suelo, agua y vegetación (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010).

Con base en las diferencias de la secuencia del gen 16S del ARN ribosomal (ARNr), el género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Jurado y colaboradores 2010; Popoff y colaboradores 2003). *Salmonella bongori* cuenta con características genéticas y clínicas peculiares, por lo cual es separada como una segunda especie, mientras que *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, basada principalmente en sus secuencias genómicas y propiedades bioquímicas (Fierer y Guiney, 2001). Hasta el año 2017 se han identificado más de 2,600 serotipos de *Salmonella*. El Cuadro 1 muestra la distribución de 2,659 serotipos del género *Salmonella*.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los serotipos de *Salmonella*.

Género	Especie	Subespecie	Serotipos
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	1,586
		<i>salamae</i> (II)	522
		<i>arizoanae</i> (IIIa)	102
		<i>diarizonae</i> (IIIb)	338
		<i>houtenae</i> (IV)	76
		<i>indica</i> (VI)	13
	<i>bongori</i>	<i>bongori</i> (V)	22

Fuente: (Graziani y colaboradores 2017).

Las condiciones de temperatura para el crecimiento de *Salmonella* oscilan entre 5-47°C, con un óptimo de 35-37°C y disminución en el metabolismo a temperaturas por debajo de 10°C y mayores

de 42°C. La muerte celular ocurre por arriba de 70°C, mientras que puede resistir a temperaturas de congelación. El rango de pH soportado por *Salmonella* oscila entre 4.0 a 9.0, con un óptimo de 6.5 a 7.5 y al disminuir a 4.1 puede provocar su inactivación (Graziani y colaboradores 2017).

El tamaño del genoma de *Salmonella* oscila entre 4.3-5.0 Mb, con un porcentaje de contenido de Guanina-Citosina de 52.1 % y un número de genes que codifican para 4,582 proteínas (NCBI, 2019). Además, algunas cepas pueden contar con ADN extracromosomal en forma de plásmidos (Baker y Dougan, 2007). La fracción del genoma bacteriano denominada como genoma núcleo o “core”, contiene información genética conservada de genes asociados con funciones celulares esenciales y está compartida por la gran mayoría de cepas dentro de una misma especie bacteriana (McGhie y colaboradores 2009). Mientras que el resto del genoma son regiones de ADN prescindibles, formado por genes “flexibles” o accesorios que incluyen elementos genéticos móviles o anteriormente móviles y con funciones genéticas como la adaptación a nichos ambientales, resistencia a antibióticos y otros genes específicos de cada cepa (Hacker y Kaper, 2000; Vernikos y colaboradores 2015). El conjunto de estos genes prescindibles y núcleo, forman un “pangenoma” que define a una especie bacteriana. Una parte importante del pangenoma es el genoma prescindible, que representa la diversidad dentro de la especie (Medini y colaboradores 2005; Rouli y colaboradores 2015; Tettelin y colaboradores 2008). Este grupo de genes, descrito como accesorio, puede contener información ligada a sus capacidades de adaptación dadas por el lugar de aislamiento y cómo éste le afecta en la virulencia, llevando a un comportamiento fenotípico diferente, por lo que es importante analizar esta sección del genoma de *Salmonella*.

2.2. *Salmonella* en el Ambiente

Salmonella pertenece al grupo de bacterias reconocidas como patógenos que se dispersa en el ambiente por las heces de individuos infectados o por ciertos animales domésticos y silvestres, de tal forma que la enfermedad (llamada salmonelosis) se contrae al ingerir el microorganismo por medio de agua o de alimentos contaminados con dichas heces (también llamada vía fecal-oral) (Brands y colaboradores 2005; Lemarchand y Lebaron, 2003; Martínez-Urtaza y colaboradores 2004). Los brotes de salmonelosis resultantes del consumo de agua y alimentos contaminados

apoyan la hipótesis de que las fuentes ambientales contribuyen a la transmisión de esta bacteria para ocasionar la enfermedad (CDC, 1999; CDC, 2002). El agua, por ser el solvente universal, se convierte en un medio de fácil diseminación, ya que no solamente disuelve, sino que arrastra, suspende y emulsiona diversas sustancias, por lo que puede contener todo tipo de sustancias inertes y microorganismos (Frenk y colaboradores 2002).

La presencia generalizada de *Salmonella* en cuerpos de agua, tanto dulces como marinas, sugieren que la transmisión por el consumo de agua o de alimentos es altamente probable (Brands y colaboradores 2005; Lemarchand y Lebaron, 2003; Martínez-Urtaza y colaboradores 2004). Esta dispersión se ha visto agudizada en zonas de descarga o punto final de aguas, como por ejemplo, zonas costeras en temporadas de precipitaciones y con vientos fuertes (Martinez-Urtaza y colaboradores 2004; Simental y Martinez-Urtaza, 2008). Debido a la alta presencia de *Salmonella*, se le ha asignado un grado de ubicuidad, y descrito un estilo de vida cíclico, que consiste en pasar a través de un huésped al ambiente y viceversa, reiniciando el ciclo (Figura 1) (Thomason y colaboradores 1977).

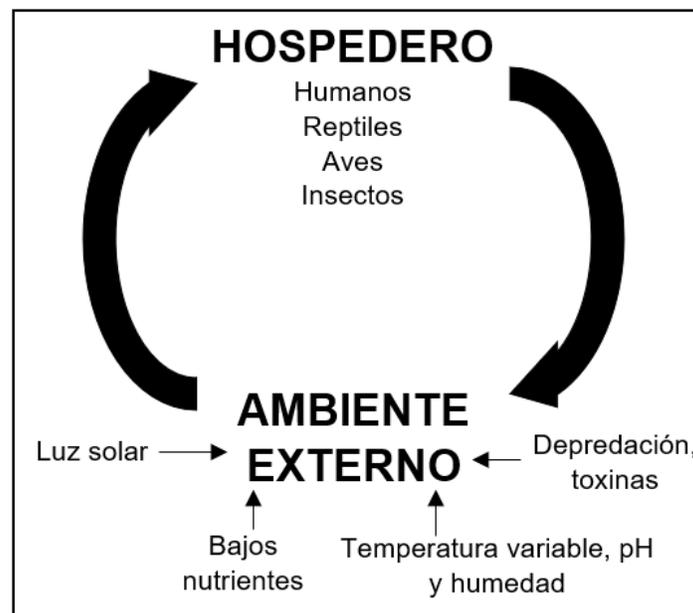


Figura 1. Ciclo de vida activo entre ambiente hospedero y no hospedero de *Salmonella* (Winfield y Groisman, 2003).

La adaptación de *Salmonella* a un ambiente externo al tracto digestivo depende de su habilidad para permanecer viable ante cambios que le generan estrés, como la baja disponibilidad de

nutrientes, estrés osmótico, variaciones de pH y temperatura, radiación solar, depredación y/o agentes tóxicos (Martinez-Urtaza y colaboradores 2004; Winfield y Groisman, 2003).

La presencia de *Salmonella* en cuerpos de agua se ha documentado ampliamente (Baudart y colaboradores 2000; Catalao y colaboradores 2000; López-Cuevas y colaboradores 2009; Martinez-Urtaza y colaboradores 2004) y algunos de los aislados acuáticos sugieren un origen proveniente de actividades terrestres, como la cría de animales (Baudart y colaboradores 2000; Brenner y colaboradores 2001). Las fuentes de contaminación pueden variar entre la vida silvestre (Chambers y Hulse, 2006; Refsum y colaboradores 2002), animales domésticos (Hutchison y colaboradores 2005; Jimenez y colaboradores 2011; Ray y colaboradores 2006) y los humanos (Kinde y colaboradores 1997), según el uso de la tierra local y el manejo de los desechos. La viabilidad de *Salmonella* en cuerpos de agua dulce sugiere que estos ambientes representan entornos relativamente estables y favorables para estas bacterias, lo que aumenta la probabilidad de prevalencia en el medio ambiente (Haley y colaboradores 2009).

Estudios en agua de río han reportado la presencia de diversos serotipos de *Salmonella*, Baudart y colaboradores (2000), aislaron 35 serotipos, dentro de los cuales Oranienburg, Saintpaul, Typhimurium, Newport y Virchow, fueron mayormente detectados durante época de inundaciones. En México, se ha estudiado la presencia y prevalencia de *Salmonella*, López-Cuevas y colaboradores (2009), aislaron 20 cepas de *Salmonella* provenientes de agua de canales de riego en el valle agrícola de Culiacán, Sinaloa, correspondiendo a los serotipos de Typhimurium, Infantis, Anatum, Agona, Oranienburg, Minnesota y Give. Otro trabajo de investigación reportó la presencia de *Salmonella* en el 36 % de muestras tomadas de agua de riego en la región central de Sinaloa, México, en las que el serotipo con mayor presencia fue Oranienburg, junto con otros siete serotipos (Estrada-Acosta y colaboradores 2014). Jiménez y colaboradores (2014), detectaron 24 serotipos de *Salmonella* en agua de ríos del Valle de Culiacán, Sinaloa, con una prevalencia de más del 80 % de las muestras tomadas y obteniendo a los serotipos Oranienburg, Saintpaul y Minnesota como principales aislados.

2.3. Epidemiología

Salmonella causa la enfermedad conocida como salmonelosis, la cual puede generar cuatro cuadros clínicos, dependiendo del serotipo responsable y del hospedero infectado: fiebre entérica, gastroenteritis, bacteremia con o sin gastroenteritis y estado de portador asintomático (Nair y colaboradores 2002). El 99 % de las salmonelosis se relacionan con serotipos pertenecientes a la subespecie *enterica* (Ellermeier y Schlauch, 2006).

Dos de los principales síndromes clínicos que ocasiona *Salmonella* en seres humanos son fiebre entérica o fiebre tifoidea y gastroenteritis infecciosa, esta última ocasionada por *Salmonella* no tifoidea (NTS). La fiebre entérica o tifoidea es una enfermedad invasiva sistémica causada por los serotipos Typhi y Paratyphi A y B de *Salmonella*, que afectan exclusivamente al ser humano. En contraste, hay muchos serotipos de NTS que causan enfermedad diarreica en el ser humano y puede, además, infectar una amplia gama de animales (Fábrega y Vila, 2013).

La infección por *Salmonella* en animales y humanos depende de la capacidad de las bacterias para sobrevivir a las condiciones adversas del tracto gástrico antes de ingresar al epitelio intestinal y, posteriormente, colonizar los ganglios linfáticos mesentéricos y los órganos internos en el caso de infecciones sistémicas. Para ingresar a las células no fagocíticas y sobrevivir dentro del entorno del huésped, *Salmonella* ha desarrollado dos mecanismos (Zipper y Trigger) para interactuar con las células huésped e inducir su propia internalización (Manon y colaboradores 2012). La dosis infectiva de la mayoría de los serotipos es de alrededor de 10^5 - 10^6 células bacterianas (Cardona-Castro y Sánchez-Jiménez, 2003).

Casos clínicos que involucran cepas de NTS como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* se producen en todo el mundo con una carga anual global estimada de 93.8 millones de casos y 155,000 muertes (Majowicz y colaboradores 2010). La incidencia de NTS en Europa causa 690 casos por cada 100,000 habitantes por año (Weinberger y Keller, 2005). En los Estados Unidos de América la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (FoodNet) reportó una incidencia de 16 casos anuales por cada 100,000 personas para el 2017 (Marder y colaboradores 2018). Para México, la Dirección General de Epidemiología a través de su Boletín Epidemiológico de 2019, contabilizó un acumulado de más de 76,000 casos de salmonelosis no tifoidea en el año 2019, denominado en el documento como “Otras salmonelosis” (DGE, 2019).

Existe un consenso general de que los esfuerzos deben centrarse en la aplicación de medidas sanitarias con el objetivo de reducir la presencia de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimentaria y disminuir los casos de infecciones por este microorganismo. Se sabe que *Salmonella* ha adoptado estrategias para adaptarse, vivir y colonizar la mucosa intestinal, y ha sufrido una compleja coevolución con sus anfitriones y otras bacterias intestinales con las que tiene que competir (Graziani y colaboradores 2017).

2.4. Patogenicidad

Los miembros del género *Salmonella* en general son reconocidos como patógenos, ya que tienen la capacidad de invadir, replicarse y sobrevivir en las células huésped humanas, lo que resulta en una enfermedad potencialmente mortal (Eng y colaboradores 2015). Estas capacidades en las bacterias se han desarrollado mediante una evolución, que consiste de tres procesos principales: 1) modificación de genes existentes; 2) pérdida de genes que ya no están bajo selección y 3) ganancia de genes que confieren beneficio para su nicho ecológico actual (Gal-Mor y Finlay, 2006). Estos últimos forman parte de los elementos genéticos móviles o genes accesorio del pangenoma bacteriano e incluyen: secuencias de inserción, transposones, integrones, plásmidos y profagos, así como grandes regiones inestables que se han denominado como “islas genómicas”. La propagación de los elementos genéticos móviles puede ser facilitada por la transferencia horizontal de genes, vía conjugación (plásmidos), transducción (fagos) y transformación (transposones) (Frost y colaboradores 2005; Hacker y Kaper, 2000; Mazel y Davies, 1999).

Las islas genómicas contienen genes asociados con diversas funciones simbióticas o patógenas de las bacterias. Las islas que cuentan con los factores de virulencia de las bacterias patógenas se conocen como “islas de patogenicidad” (PAIs, por sus siglas en inglés). De una manera similar, y dependiendo de la función para la que codifique cada isla, se les puede llamar metabólica, de simbiosis o de resistencia (Hacker y Kaper, 2000).

Las PAIs contienen uno o más factores de virulencia. Aunque se debe tener en cuenta que en algunas bacterias patógenas estos factores contribuyen al potencial patógeno, mientras que en otras bacterias no patógenas los mismos factores pueden ser importantes para la supervivencia y la

replicación en nichos ecológicos particulares, donde no crean ningún potencial patógeno (Schubert y colaboradores 2004).

La capacidad de los serotipos de *Salmonella* para causar infección en humanos y animales se basa en la expresión de genes de virulencia, muchos de ellos ya conocidos, lo que facilita la salida y la anulación de la defensa del huésped (Fábrega y Vila, 2013). Estas características de los serotipos de *Salmonella* se asocian con los factores de virulencia contenidos en las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs), plásmidos de virulencia, sistemas de adhesión, profagos, sistemas de secreción, etc. Algunos de estos factores codifican proteínas efectoras que desempeñan un papel importante en la patogénesis de *Salmonella* (Foley y colaboradores 2013; van Asten y van Dijk, 2005; Wilharm y Heider, 2014).

Existen numerosos factores de virulencia que contribuyen a la invasividad de *Salmonella*, como la producción de sideróforos quelantes del hierro que sustraen el hierro necesario para el crecimiento del microorganismo, los antígenos polisacárido O, flagelar H y las fimbrias que potencian la adherencia del patógeno; mientras que el polisacárido capsular Vi inhibe la unión del complemento y la muerte por anticuerpos. Los genes *inv* (de invasión) de *Salmonella* que codifican por lo menos diez proteínas que promueven la invasión, tales como InvA, InvB, entre otros. Por ejemplo, *invH* codifica para una adhesina de superficie, mientras que otros genes *inv* codifican para proteínas importantes para el tráfico de proteínas de virulencia. La proteína reguladora InvJ controla el ensamblaje de las proteínas estructurales InvG, PrgH, PrgI, PrgJ y PrgK, que forman un complejo de inyección denominado inyectosoma. Este orgánulo de la envoltura bacteriana permite introducir proteínas de virulencia en las células del huésped a través de un mecanismo de ensamblaje con forma de aguja. Otros factores son las proteínas codificadas por los genes *oxy* y *pho*, donde las primeras actúan neutralizando los productos tóxicos de oxígeno producidos por macrófagos (reguladas por OxyR), y las segundas proteínas (codificadas por los genes *phoP* y *phoQ*) neutralizando a las defensinas, moléculas antibacterianas producidas por los macrófagos, potenciando la patogenicidad de *Salmonella* (Madigan y colaboradores 2009; Manon y colaboradores 2012).

La unión de *Salmonella* a las células del huésped es mediada por genes fimbriales, como las del tipo 1 (*fim*), fimbrias polares largas (*lpf*), fimbrias delgadas agregativas (*agf*) o fimbrias codificadas en plásmidos (*pef*) (Chen y colaboradores 2020).

Para ejemplificar una infección, tomaremos como modelo a *S. Typhimurium*. Este proceso es

iniciado por la colonización bacteriana en el intestino a través de la activación de inflamación por genes codificados por el profago SopE y moléculas efectoras secretadas por la SPI-1, y un sistema de secreción tipo 6 (SST6) de la SPI-6. Los sistemas de dos componentes PhoP-PhoQ (donde PhoQ es un sensor de membrana interna y PhoP un regulador citoplasmático) y PmrA-PmrB (donde PmrA es un regulador de respuesta y PmrB un sensor quinasa sensible al hierro férrico extracitoplasmático) regulan la resistencia a los péptidos antimicrobianos. Las proteínas de superficie codificadas en la SPI-3 e SPI-4 impulsan la unión a las células epiteliales, y la endocitosis mediada por la bacteria en las células epiteliales es inducida por los productos génicos de las SPI-1 e SPI-5. La modificación del endosoma de *Salmonella* y su supervivencia dentro de la vacuola que la contiene (SCV) está impulsada por la SPI-1 y el profago Gifsy-1. Dentro de la SCV y en las células inmunes (como los neutrófilos y los macrófagos), la resistencia a las respuestas inmunes (como el estrés oxidativo), están mediadas por los profagos Gifsy-2 y Fels-1, y la SPI-11, SPI-12 e SPI-16. La supervivencia dentro de macrófagos es mediada por las SPI-2, SPI-5 e SPI-13 (Figura 2) (Fábrega y Vila, 2013; Graziani y colaboradores 2017; Ilyas y colaboradores 2017).

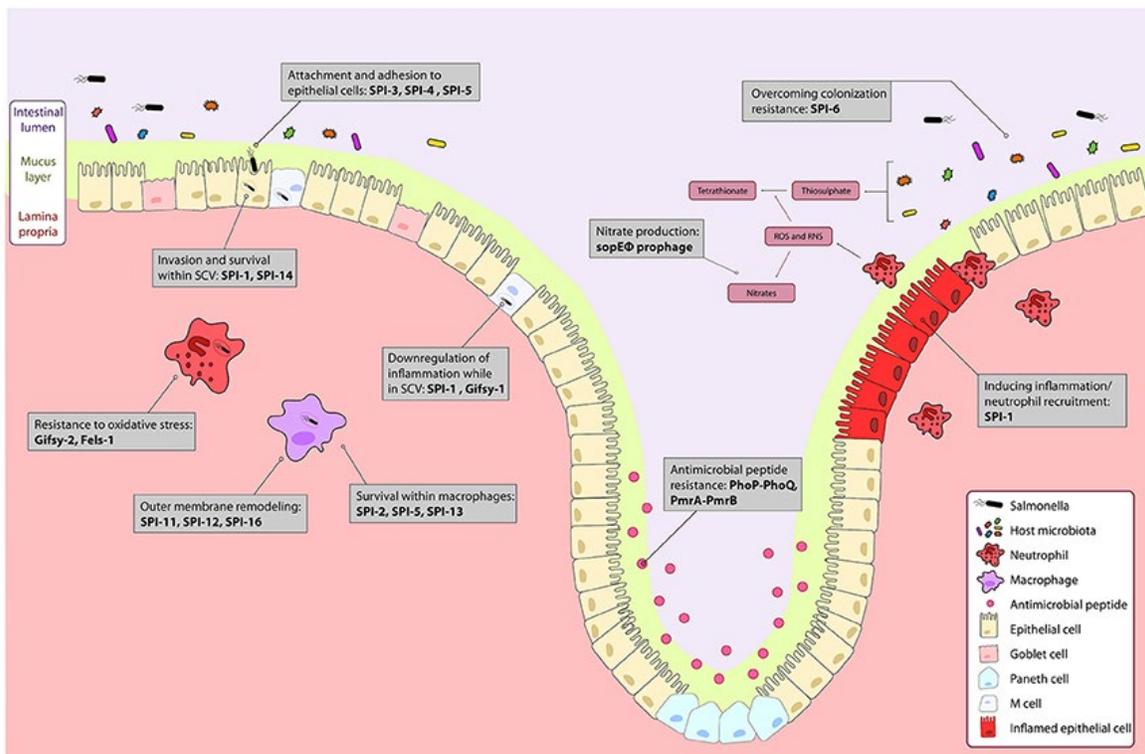


Figura 2. Curso de la infección por *Salmonella* dentro del intestino y los factores de virulencia que lo conducen (Ilyas y colaboradores 2017).

2.4.1. Islas de Patogenicidad de *Salmonella*

Existen reportadas más de 20 SPIs presentes en ambas especies y todas las subespecies de *Salmonella*, pero se presta mayor atención en las primeras cinco islas y en especial a SPI-1 y SPI-2 por su función en la invasión, supervivencia y replicación dentro de las células huésped, como macrófagos y células epiteliales (Fábrega y Vila, 2013; Graziani y colaboradores 2017).

SPI-1. Es una región de ADN de 40 kb que codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-1), siendo InvA/G, SpaP/Q/R/S y PrgH/J/K algunas de las principales proteínas que componen este sistema, el cuál transporta diversas proteínas bacterianas al citosol de las células huésped, que resulta en reordenamientos del citoesqueleto que median la captación de *Salmonella* en una vesícula unida a la membrana (Graziani y colaboradores 2017; Lou y colaboradores 2019). La función principal de la SPI-1 durante la infección por *Salmonella* es la mediación de la invasión en las células epiteliales del intestino y apoptosis de macrófagos (Graziani y colaboradores 2017; Hacker y Kaper, 2000). Algunas proteínas secretadas para estas tareas son SopB, SipC, SipD, SopE2 y específicamente SopE, que promueve la colonización de *Salmonella* (Lopez y colaboradores 2012; Santos y colaboradores 2009). SopE y SopB están codificadas fuera de la SPI, aunque utilizan el T3SS que se encuentra en ésta. SopE se localiza en el profago SopE ϕ y en algunas cepas de *S. Typhimurium* en el cromosoma, mientras SopB en la SPI-5 (Hacker y Kaper, 2000; Sabbagh y colaboradores 2010).

SPI-2. Al igual que la SPI-1, esta isla es una región de ADN de 40 kb que codifica un segundo sistema de secreción tipo III (T3SS-2), donde SseF/G, PipB/B2 y SteA/D son algunas de las principales proteínas de este sistema que transloca múltiples efectores al citosol de la célula huésped, que altera funciones celulares del hospedero, promoviendo así la supervivencia y replicación intracelular bacteriana (Galan, 2001; Jennings y colaboradores 2017; McGhie y colaboradores 2009), por lo tanto, participa en la modificación del entorno intracelular encontrado por *Salmonella*. Además del T3SS-2, existen dos efectores translocados, SseF y SseG, localizados en la SPI-2 necesarios para supervivencia dentro de macrófagos (Ochman y colaboradores 1996; Shea y colaboradores 1996). Debido a la similitud estructural entre el T3SS y el flagelo, *Salmonella* utiliza este último no solo para la locomoción, sino también para la translocación de factores de virulencia en las células huésped eucariotas (Diepold y Armitage, 2015).

SPI-3. Es un fragmento de 17 kb necesario para la supervivencia intrafagosómica. Dentro de esta isla se encuentran los genes que codifican al operón *mgtBC*, requerido para la invasión de macrófagos, adaptación a condiciones de bajo contenido de Mg^{2+} y bajo pH encontrados en el entorno vacuolar intracelular (Dos Santos y colaboradores 2019; Graziani y colaboradores 2017). Otro gen encontrado en esta isla es el que codifica para la proteína MisL, que contribuye a la colonización y persistencia intestinal a largo plazo, en conjunto con el gen *siiE* de la SPI-4, debido a que se une a la fibronectina de las células epiteliales del hospedero (Ilyas y colaboradores 2017). Además, MarT cuenta con funciones reguladoras, como la activación de la expresión de *misL* (Dos Santos y colaboradores 2019).

SPI-4. Tiene un tamaño aproximado de 27 kb, designada como isla de patogenicidad basada en el contenido de un operón llamado *siiABCDEF* que codifica un sistema de secreción tipo 1 (T1SS) requerido para la colonización intestinal (Dos Santos y colaboradores 2019; Hallstrom y McCormick, 2015). La evidencia que existe acerca de su efecto en la virulencia de *Salmonella* describe que las deleciones hechas en los seis genes o en mutaciones hacia la isla disminuyen la adherencia en células epiteliales (Gerlach y colaboradores 2007; Kiss y colaboradores 2007).

SPI-5. Es una isla compuesta por 5 genes, *pipA*, *pipB*, *pipC/sigE*, *pipD* y *sopB/sigD*. La proteína SopB (SigD en *S. Typhimurium*) es expresada y translocada por el T3SS-1 durante la infección para promover la invasión y ondulación de la membrana, mientras que PipB es activada cuando *Salmonella* se internaliza en las células huésped y se transloca por el T3SS-2 para promover la supervivencia dentro de macrófagos. Se ha asociado que la eliminación de *pipA* reduce la virulencia durante la infección en ratones (Dos Santos y colaboradores 2019; Ilyas y colaboradores 2017).

SPI-6. El tamaño de esta isla es de 47 kb en *S. Typhimurium* y de 59 kb en *S. Typhi*. Se ha documentado que la eliminación completa de esta isla reduce la internalización de *S. Typhimurium* en células Hep2. En ambos serotipos se encuentra un sistema de secreción tipo VI (T6SS), el grupo de genes fimbriales *safABCD* y la proteína invasina PagN (Hallstrom y McCormick, 2015; Sabbagh y colaboradores 2010).

SPI-11. Esta isla tiene relevancia en la etapa de infección dentro de macrófagos, contribuyendo en la patogénesis y supervivencia del patógeno. Se encuentra tanto en *S. Typhi* (10 kb) como en *S. Typhimurium* (6.7 kb) con algunas deleciones en este último serotipo. La componen los genes *pagD*, *envE*, *envF* que participan en el reacondicionamiento de la membrana externa, mejorando la resistencia a las defensas inmunitarias. Además del gen *pagD* se encuentra *pagC*, los cuales son

activados por PhoPQ y están involucrados en la supervivencia dentro de macrófagos (Ilyas y colaboradores 2017; Sabbagh y colaboradores 2010).

SPI-12. Con un tamaño de 15.8 kb en *S. Typhimurium*, contiene 11 marcos abiertos de lectura (ORFs) que incluyen proteínas putativas y genes asociados a fagos, y al gen *sspH2*, el cual es secretado por el T3SS-2 (Ilyas y colaboradores 2017; Sabbagh y colaboradores 2010). La transcripción de *sspH2* es inducida dependientemente de SrrB durante la supervivencia dentro de macrófagos RAW264.7, siendo las bacterias mutantes de *sspH2* (no portadoras del gen) no inductoras de una infección letal en terneros (Miao y colaboradores 1999; Tomljenovic-Berube y colaboradores 2013). Se ha visto que SPI-12 se requiere para la infección sistémica en ratones provocada por *S. Typhimurium* 14028 (Haneda y colaboradores 2009).

SPI-13. Esta región de 25 kb contiene los ORFs desde STM3117 a STM3123 en *S. Typhimurium*, codificando genes de proteínas putativas de liasa, hidrolasa, oxidasa, arilsulfatasa, un regulador arilsulfatasa, así como dos reguladores transcripcionales putativos de la familia LysR. En el serotipo *S. Typhimurium* 14028 los ORFs STM3117-STM3121 son genes relacionados con virulencia y asociados con la infección sistémica en ratones y en la replicación dentro de macrófagos murinos (Sabbagh y colaboradores 2010).

SPI-16. Este fragmento de 4.5 kb codifica para tres genes (*yfdH*, *rfbI* y STM0557) que muestran una alta identidad con genes del fago P22 y se ha visto su relación con la persistencia intestinal en ratones (Hallstrom y McCormick, 2015; Ilyas y colaboradores 2017).

La actuación de estas SPIs y de otros factores de virulencia son importantes en el proceso de infección, tal es el caso de profagos y remanentes de fagos insertados en el genoma bacteriano. Además de la contribución que los profagos aportan a la diversidad genética de cepas de *Salmonella*, pueden aportar genes involucrados en virulencia (Sabbagh y colaboradores 2010). De los profagos mejor caracterizados en *Salmonella*, y en su mayoría del serotipo Typhimurium, se encuentran los pertenecientes a la familia P2 (SopE ϕ , Fels-1 y Fels-2) y los de la familia Lambda (Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3 y P22), entre otros (Brussow y colaboradores 2004). *S. Typhimurium* LT2 contiene los profagos Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1 y Fels-2, mientras que *S. Typhimurium* 14028s contiene Gifsy-1, Gifsy-2, Gifsy-3 y ST64B (Paul y colaboradores 2016; Sabbagh y colaboradores 2010).

2.4.2. Profagos

Gifsy-1. Gifsy-1 y Gifsy-2 son de importancia patogénica debido a la influencia que tienen en la interacción de *Salmonella* con las células del hospedero (Ilyas y colaboradores 2017). Gifsy-1 está presente en la mayoría de las cepas de *S. Typhimurium* y codifica tres genes involucrados en la supervivencia intracelular (*gogB*, *sarA* y *pagK2*). El gen *gogB* es un efector que puede ser translocado por las SPIs 1 y 2 e inhibe la activación de NF- κ B (grupo de proteínas que controlan respuestas inmunitarias e inflamatorias) mediante la interacción con los factores del hospedero SKP1 y FBXO22. Se cree que este efecto antiinflamatorio limita el daño tisular en infecciones a largo plazo, mientras que en infecciones a corto plazo mejora la habilidad de colonización en el intestino. SarA activa una vía antiinflamatoria en la célula eucariota hospedera, mientras PagK2 se secreta en vesículas de la membrana externa producidas por la misma bacteria, contribuyendo a la supervivencia intracelular en macrófagos (Wahl y colaboradores 2019).

Gifsy-2. Codifica a SseI, una proteína efectora translocada por el T3SS-2, presente en la mayoría de las cepas de *S. Typhimurium* (Ehrbar y Hardt, 2005). Además de esta proteína, Gifsy-2 codifica a SodC, encargada del establecimiento de *Salmonella* dentro de macrófagos (Wahl y colaboradores 2019). La eliminación de estos dos profagos reduce la virulencia en un modelo murino en ciertas cepas de *S. Typhimurium* (Figueroa-Bossi y Bossi, 1999).

Gifsy-3. Codifica la proteína efectora SsH1 y está presente en pocas cepas de *S. Typhimurium*, como la cepa ATCC 14028s. Esta proteína es translocada por los T3SS-1 y T3SS-2 y está involucrada en la modulación descendente de la producción de IL-8 después de la invasión en las células epiteliales (Ehrbar y Hardt, 2005).

SopE Φ . El profago SopE codifica al efector SopE, que se puede encontrar también en el genoma de algunas cepas de *S. Typhimurium* y en otras ausente (Sabbagh y colaboradores 2010). Otra proteína efectora es SopE2, esta es ~70 % idéntica a SopE, esto es el caso de *S. Typhimurium* ATCC 14028s, ya que carece de SopE y expresa *SopE2*. Las dos proteínas interactúan con las células epiteliales para activar eventualmente la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-23, dentro de las pocas diferencias está una mejor interacción bacteria-hospedero por parte de SopE al activar dos moléculas de señalización de la células huésped (Cdc42 y Rac1), en cambio SopE2 solo activa una (Cdc42) (Ehrbar y Hardt, 2005; Ilyas y colaboradores 2017).

2.4.3. Plásmidos

Los plásmidos contienen genes esenciales para funciones de mantenimiento y para el inicio y control de la replicación, ya que esta última función la llevan a cabo de forma autónoma en la célula huésped. Sin embargo, muchos plásmidos contienen genes que son útiles para su huésped también, por ejemplo, algunos plásmidos contienen genes encargados de la resistencia a antimicrobianos, de la degradación de compuestos orgánicos y de los factores de virulencia, incluyendo la producción de toxinas (Couturier y colaboradores 1988).

La tipificación de plásmidos se basa en la incompatibilidad con otros plásmidos, la cual se define como la incapacidad de dos plásmidos para propagarse de manera estable en la misma línea celular. Esto se debe al control de replicación con el que cuenta cada plásmido, de modo que si los dos cuentan con el mismo control de replicación son incompatibles, mientras que los plásmidos con diferentes controles de replicación suelen ser compatibles (Couturier y colaboradores 1988; Novick y colaboradores 1976). Algunos de los grupos de incompatibilidad de plásmidos encontrados en *Salmonella* se enlistarán a continuación.

IncC. Los plásmidos IncC son grandes, con una variedad de hospedadores y frecuentemente contienen genes de resistencia a antimicrobianos (AMR) (Harmer y Hall, 2015). Se han aislado plásmidos IncC en *Salmonella* que contienen hasta 10 genes AMR para más de cinco clases de antibióticos. Entre los genes AMR comúnmente transportados por IncC son *strA/B* (aminoglucósidos) que codifican enzimas inactivadoras de estreptomicina (Sundin y Bender, 1996; Zhang y colaboradores 2020), *sul2* (sulfonamidas) que codifica formas de dihidropteroato sintasa que no es inhibida por el antibiótico (Enne y colaboradores 2001), *tetA/R* (tetraciclina) cuyo mecanismo de resistencia reside en la expulsión activa de la tetraciclina (Marti y colaboradores 2006), *bla_{CMY-2}* (β -lactámicos) y *floR* (cloranfenicoles) la cual codifica una enzima inactivadora del antibiótico (Lu y colaboradores 2018), así como otros genes que agregan más clases de antibióticos para resistencia a cefalosporinas y trimetoprima (McMillan y colaboradores 2020).

IncF. Los plásmidos IncF cuentan con una longitud mayor a 80 kb y el hospedador está restringido a *Enterobacteriaceae*. Estos son importantes debido a que muchos de los plásmidos de virulencia en *Salmonella* son IncF (Rozwandowicz y colaboradores 2018; Silva y colaboradores 2017). Ejemplos de genes de virulencia son los genes contenidos en el operón *spv*, relacionado en la

invasividad y la toxicidad del hospedador (Guiney y Fierer, 2011). Los serotipos de *Salmonella* Typhimurium, Dublin, Choleraesuis, Gallinarium, Sendai, Abortusequi, Abortusovis y Enteritidis contienen un plásmido de virulencia de este tipo (IncF) (McMillan y colaboradores 2020).

Los plásmidos IncF pueden portar múltiples replicones, como los FIA, FII o FIB, que puede impulsar la adquisición de otros plásmidos que porten replicones incompatibles cuando la replicación sea impulsada por uno compatible (Villa y colaboradores 2010). También han sido aislados conteniendo genes AMR, portando los genes relacionados a la resistencia de quinolonas (*oqxA/B*, *qnrS*), cloranfenicoles (*cmlA1*, *floR*), a trimetoprima (*dfrA12*) y aminoglucósidos (*aac(6')-Ib*, *aphA*) (Chen y colaboradores 2018; Garcia y colaboradores 2014; Han y colaboradores 2012; McMillan y colaboradores 2019).

IncHI. Los plásmidos IncHI se clasifican en tres grupos: HI1, HI2 y HI3 (Geddes y Goodall, 1972; Rozwandowicz y colaboradores 2018). Estos plásmidos son generalmente conjugativos y tienen una longitud que varía de 75 a 400 kp (Rozwandowicz y colaboradores 2018). Los plásmidos HI1 y HI2 a menudo se aíslan en *Salmonella*, pero estos no están restringidos solo por este hospedador (McMillan y colaboradores 2020).

Se han aislado plásmidos IncHI que contienen genes de resistencia a metales pesados, *MerE/D/A/C/P/T/R* (mercurio), *CopE2/A/B/C/D/R/S/E1* (cobre), *ArsC/B/R/H* (arseniato) y otros asociados con genes de resistencia a estreptomicina y sulfonamidas (Cain y Hall, 2012a; Cain y Hall, 2012b; Gilmour y colaboradores 2004; Rozwandowicz y colaboradores 2018). Un ejemplo de estos plásmidos se encuentra en la cepa de *Salmonella* Typhi multirresistente a antibióticos que circula a nivel mundial con plásmidos HI1 conteniendo los genes *cat*, *strA/B*, *tetA/B*, *sul2* y *bla_{TEM-1}* (Phan y colaboradores 2009).

IncII. Los plásmidos IncII son conjugativos y como los IncF, son limitados a *Enterobacteriaceae* como hospedador (Carattoli y colaboradores 2018). Estos plásmidos juegan un papel importante en la diseminación y persistencia de genes β -lactamasa, así como otros como *bla_{CMY-2}*, *aadA*, *sull* y *tetA* (Carattoli y colaboradores 2018; Folster y colaboradores 2011; Folster y colaboradores 2012; Han y colaboradores 2012).

2.4.4. Resistencia Antimicrobiana

Desde la introducción de los antibióticos, el uso de millones de toneladas de éstos, ha causado una presión de selección en las bacterias patógenas, haciendo que éstas desarrollen resistencia a los antibióticos de uso común, ya que las bacterias que no se eliminaron por el antibiótico en uso, pueden ser promovidas o seleccionadas indirectamente como aptas para persistir y transferir la estrategia de resistencia que logró funcionar bajo esta presión a otras bacterias (Laxminarayan y colaboradores 2013; Zhao y colaboradores 2020; Zhao y colaboradores 2017).

Además de la presión selectiva, se estima que los genes transferibles de resistencia son otro factor que genera la AMR. Entre los antibióticos más comúnmente utilizados en medicina veterinaria y agregados en el alimento de los animales, destacan: las penicilinas, tetraciclinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, avoparcina y virginiamicina (JECFA, 2000). Los principales mecanismos de resistencia son la inhibición del antibiótico a través de la modificación química de este por acción de una enzima, la eliminación mediante bombas de eflujo, la modificación del sitio diana de los medicamentos y el cambio en la permeabilidad de la pared celular bacteriana (Chen y colaboradores 2004; Zhao y colaboradores 2020). Así mismo, la formación de biopelícula puede presentarse como una estrategia de resistencia a antimicrobianos, ya que propicia una baja o incompleta penetración del antibiótico dentro de la biopelícula y por ende a la población bacteriana, también por un cambio de pH dentro de la biopelícula causado la acumulación de residuos ácidos de las bacterias y afectando el funcionamiento del antibiótico (Rajput y colaboradores 2018; Stewart y Costerton, 2001).

La resistencia a los antimicrobianos en los serotipos de *Salmonella* no tifoidea es un problema global. Los datos de vigilancia demuestran un aumento en la resistencia a los antimicrobianos entre estas bacterias del 20-30 % a principios de la década de 1990 a un 70 % en algunos países al final del siglo XX (Su y colaboradores 2004). Sin embargo, la tasa de resistencia varía con los diferentes serotipos y diferentes antibióticos (Lauderdale y colaboradores 2006; Lee y colaboradores 2009; Parry y Threlfall, 2008).

Por ello, es importante hacer uso de tecnologías como la secuenciación del genoma en conjunto con pruebas fenotípicas de AMR denominadas como métodos estándar, dentro de las que se encuentran la microdilución en caldo y la difusión en disco. Estas metodologías fenotípicas como

en otras, cuenta con desventajas, como la reproducibilidad ya sea por el operador o por parámetros que afecten el crecimiento del microorganismo o a la estabilidad de los reactivos, además de los diferentes criterios interpretativos existentes en diferentes organizaciones que no los hacen totalmente compatibles. Así mismo, las condiciones *in vitro* (de laboratorio) no son las mismas que *in vivo* (en el huésped) y por lo tanto las dinámicas de crecimiento bacteriano con antibióticos pueden dar respuestas diferentes. Claro que los estudios *in vitro* se tratan de acercarse a un comportamiento real de las condiciones y eso apoya a los estudios genotípicos. La caracterización genética y los datos recabados de esta pueden ser almacenados y analizados indefinidamente sin una afectación por condiciones físicas y se puede detectar cualquier gen o mutación conocida relacionada a la AMR (Acar y colaboradores 1970; Bortolaia y colaboradores 2020; Hendriksen y colaboradores 2009; Mouton, 2018; Pedersen y colaboradores 2018; Thaker y colaboradores 2015). Al hacer uso de estas dos metodologías se fortalece la información obtenida que servirá para conocer si existe un comportamiento de resistencia hacia antibióticos conocidos y evaluados *in vitro*, así como la presencia de genes relacionados a algún tipo de resistencia hacia un agente antimicrobiano conocido en otras bacterias.

2.5. Formación de Biopelículas

La habilidad de formación de biopelículas es un factor importante en la virulencia de *Salmonella* debido a que promueve la supervivencia de la bacteria tanto dentro como fuera del hospedero cuando esta es expuesta a un entorno limitante de nutrientes, pH ácido, calor, bajas temperaturas y a antimicrobianos (Hamilton y colaboradores 2009). La formación de biopelículas puede desencadenar una persistencia crónica cuando se encuentra dentro del huésped, creando portadores libres de síntomas que actúan como reservorios, contribuyendo a la propagación del patógeno en hospederos (Chausse y colaboradores 2011; Crawford y colaboradores 2010; Sirinavin y colaboradores 2003).

La producción de biopelículas es un ejemplo del comportamiento grupal que estos microorganismos desarrollan en coordinación, bajo el monitoreo de la densidad celular detectada a su alrededor mediante la síntesis y secreción de moléculas señal o moléculas autoinductoras (AI), representadas por acil-homoserina lactonas, también llamadas moléculas autoinductoras-1 (AI-1) sintetizadas por

el sistema LuxR-LuxI (Zhao y colaboradores 2020). Así como existen las AI-1, usadas principalmente por las bacterias Gram negativas, también existen AI utilizadas por bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas, representadas por diéster de borato de furanosilo o descritas como AI-2, producidas por la proteína LuxS (Choi y colaboradores 2012; Zhao y colaboradores 2020). Cuando la concentración de estas moléculas incrementa hasta llegar a un cierto umbral correspondiente con la población bacteriana, se inicia la expresión de genes específicos que pueden regular la adaptación de la población. A este sistema de regulación se le conoce como “quórum sensing” (QS) o detección de quórum y se conoce que regula varios procesos celulares, como la luminiscencia bacteriana, factores de virulencia, tolerancia a desinfectantes, formación de esporas, producción de toxinas y AMR (Zhao y colaboradores 2020). Por ejemplo, la regulación negativa del QS por exceso de LsrR puede reducir la virulencia de *Salmonella* al dificultar la evasión de este microorganismo de una muerte oxidativa dentro de macrófagos (Cui y colaboradores 2020).

En *Salmonella*, existen tres componentes de la matriz extracelular que son importantes para la formación de biopelículas: celulosa, proteína Curli y la proteína celular BapA (biofilm-associated protein) (Austin y colaboradores 1998; Latasa y colaboradores 2005), además de la capsula de antígeno O (Barak y colaboradores 2007) y ADN extracelular (Johnson y colaboradores 2013; Wang y colaboradores 2014). La síntesis de celulosa depende de proteínas codificadas dentro de dos operones expresados constitutivamente, *bcsABZC* y *bcsEFG* (bacterial cellulose biosynthesis) (Solano y colaboradores 2002). La información para síntesis de la proteína Curli se encuentra dentro de dos operones *csgBAC* y *csgDEFG* (curli specific genes) (Römling, Bian, y colaboradores 1998). Para el tercer componente, la proteína BapA, es codificada por su respectivo gen (*bapA*), requerida para la formación de biopelícula, ya que la ausencia de esta proteína conduce a la pérdida de esta capacidad (Latasa y colaboradores 2005).

La celulosa es un polisacárido compuesto de unidades de D-glucosa, sintetizado por *Salmonella* durante la formación de biopelículas (Römling, 2002). Su biosíntesis se activa positivamente por el regulador de respuesta CsgD, que estimula la transcripción de *adrA*, siendo ésta la que activa la producción de celulosa a nivel postranscripcional, ya sea por la interacción directa con operones *bcs* (*bcsA/B/C/Z* y *bcsE/F/G*) o por la interacción con el ácido di-(3'-5')-guanosin-monofosfato (di-GMPc) que actúa como molécula de señalización en el proceso de regulación para la producción de exopolisacáridos en bacterias (Ramírez-Mata y colaboradores 2014; Römling, 2005).

Curli es un intermediario durante la adhesión e invasión a la célula, y es un inductor de la respuesta

inflamatoria del huésped (Barnhart y Chapman, 2006). BapA es una proteína de superficie celular requerida en la biopelícula bacteriana, secretada a través del T1SS (operones *bapBCD*). La expresión del gen que lo codifica (*bapA*) es coordinada por los genes codificantes de Curli y celulosa, a través de la acción de *csgD* (Latasa y colaboradores 2005; Latasa y colaboradores 2006). Los operones *yihU-yshA* y *yihVW* son los responsables del ensamblaje y la translocación de la cápsula de antígeno O (Anriany y colaboradores 2001), además es regulada por la proteína CsgD. Esta cápsula juega un rol importante de fijación y persistencia ambiental (Barak y colaboradores 2007), requerida para la formación de biopelícula en algunos serotipos de *Salmonella* que se han localizado en cálculos biliares (Crawford y colaboradores 2008). Se ha visto que el ADN extracelular forma parte de la matriz de biopelículas de *Salmonella* cultivadas en cámaras de flujo y en superficies de vidrio. Sin embargo, la presencia del ADN tiene un efecto inhibitor y desestabilizador durante el desarrollo de biopelícula en superficies abióticas (Wang y colaboradores 2014).

Dentro del operón *csgDEFG* se encuentra *csgD*, miembro de la familia LuxR, que ha sido descrito como el regulador principal de la producción de biopelícula. Así mismo, *CsgD* controla la expresión del morfotipo RDAR (por sus siglas en inglés, rojo, seco y rugoso) (Römling, Sierralta, y colaboradores 1998; Zogaj y colaboradores 2001). La producción de celulosa y Curli conduce a una matriz de células compactas cubiertas en una red hidrofóbica (Peng, 2016).

Otro componente para la formación de biopelícula que se ha mencionado es el ácido colánico. En este tema, algunas investigaciones concluyen que este compuesto contribuye a la formación de biopelícula en *E. coli* y *Salmonella*, además se ha reportado que confiere resistencia a condiciones estresantes del medio ambiente, como la hiperosmolaridad, pH ácido, estrés oxidativo, desecación y temperaturas extremas; sin embargo, no se ha definido una función fisiológica precisa del ácido colánico (Pando y colaboradores 2017). El ácido colánico es un polisacárido de subunidades repetidas de azúcares D-glucosa, L-fucosa, D-galactosa y ácido D-galacturónico con cadenas laterales de O-acetilo y piruvato, que se ha estudiado su expresión cuando *E. coli* se adhiere a superficies abióticas (Boddicker y colaboradores 2002; Collinson y colaboradores 1996; Gonzalez-Escobedo y colaboradores 2011; Wang y colaboradores 2013). La biosíntesis de ácido colánico ha sido identificada en un grupo de 19 genes en *E. coli* (Römling, 2005), también lo ha sido en *S. Typhimurium* (Prouty y colaboradores 2002; Römling, Bian, y colaboradores 1998). Este grupo de genes comprende más de un operón, *wcaABCDEFGHIJKL*, *manBC*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gmd*, *fcl*, *gmm*,

wzx (Stevenson y colaboradores 2000; Wang y colaboradores 2013).

Diversos serotipos de *Salmonella* productores de biopelícula expresan el morfotipo RDAR en placas de agar rojo Congo, indicando la producción de celulosa y Curli (Römling, 2005). Si se interrumpe la expresión de alguno de estos componentes o los dos, conduciría al desarrollo de distintos morfotipos. Por ejemplo, si existe un defecto en la síntesis de celulosa conducirá a colonias de color café, seco y rugoso (BDAR), y si el defecto es en la expresión de Curli presentará un morfotipo rosado, seco y rugoso (PDAR) (Malcova y colaboradores 2008). Aunque se ha descrito que el morfotipo BDAR carece o tiene defecto en la síntesis de celulosa, Contreras-Soto y colaboradores (2021), detectaron trazas de celulosa en las biopelículas producidas por cepas de *S. Infantis* de morfotipo BDAR. La deficiencia de Curli y celulosa se asocia con colonias lisas y blanquecinas (SAW) y el morfotipo liso, café y mucoide (SBAM) al igual que el SAW, no dependen de la celulosa y Curli, sin embargo, SBAM depende de la sobreproducción del polisacárido capsular (Lamas y colaboradores 2016; Malcova y colaboradores 2008). Otro morfotipo asociado a la producción de celulosa y Curli es el morfotipo SPAM (suave, rosado y mucoide), que no había sido reportado antes, descrito en una cepa de origen clínico y en una cepa de origen ambiental, ambas *S. Oranienburg*, en el que se detallan además de estos componentes, carbohidratos como manosa, glucosa y galactosa como parte de la composición de las biopelículas producidas por estas cepas (Contreras-Soto y colaboradores 2021).

Investigaciones como la de Pande y colaboradores (2016), concluyeron que el morfotipo expresado por las cepas de *Salmonella* aisladas de granjas avícolas dependían de la temperatura y estaba asociado con los serotipos. Uno de los serotipos involucrado fue *S. Oranienburg*, mostrando una formación de colonias RDAR a 22 °C en 29 de las 30 cepas de *S. Oranienburg*, mientras que a 37 °C todas mostraron un morfotipo SAW. Mediante la misma metodología en agar con rojo Congo, Solomon y colaboradores (2005), obtuvieron un morfotipo RDAR en *S. Oranienburg* aislada de melón cantaloupe a 28 °C durante una incubación de 40 horas. Recientemente se estudió este rasgo en dos cepas de *S. Oranienburg* de diferente origen de aislamiento (agua y heces) con resultados de un morfotipo rugoso incompleto, asociado a SBAM, en condiciones de incubación de 28 °C por 7 días (Medrano-Félix y colaboradores 2018).

Jonas y colaboradores (2007), investigaron el rol que desempeñan la celulosa, Curli y la proteína BapA, encontrando que la interrupción en la síntesis de BapA no alteró la morfología de la colonia ni la habilidad para formar biopelícula dentro de 24 h, y que la celulosa y Curli tienen mayor

impacto en la formación y morfología de la biopelícula, en donde Curli parece ser más importante para formación de agregados celulares que la celulosa.

2.6. *Salmonella* Oranienburg

Debido a la alta prevalencia de serotipos de *Salmonella enterica* en cuerpos de agua de la región del Valle de Culiacán (Estrada-Acosta y colaboradores 2014; Jiménez y colaboradores 2014; López-Cuevas y colaboradores 2009), ha cobrado relevancia e interés el estudio de este patógeno y su ciclo de vida, por lo que se han hecho uso de cepas representativas involucradas en constantes asilamientos de ambientes no hospederos como los ríos, tal es el caso de serotipos de *Salmonella* como Saintpaul, Minnesota, Infantis y Oranienburg, entre otros, resaltando éste último serotipo como relevante en el presente trabajo de investigación, ya que corresponde a las cepas en estudio *S.* Oranienburg (S-76) (Jiménez y colaboradores 2014), asilada de agua de río y la cepa aislada de un caso clínico, *S.* Oranienburg (S-347) (Vázquez-Garcidueñas y colaboradores 2014). Los frecuentes aislamientos de cepas del mismo serotipo a lo largo del tiempo, abrió diversas líneas de investigación en el grupo de investigación, encaminadas a evaluar la capacidad de adaptación de *Salmonella* en diferentes ambientes, las fuentes de carbono que es capaz de utilizar esta bacteria en un hospedero o fuera de este (Medrano-Felix y colaboradores 2017), el uso de estrategias como la formación de biopelículas para superar entornos estresantes (Medrano-Félix y colaboradores 2018), el potencial patogénico de cepas que estuvieron expuestas al agua de río y el efecto de este entorno en aislados clínicos, el perfil de genes relacionados con virulencia y la composición genética que integra cada aislado (Estrada-Acosta y colaboradores 2018).

En este contexto, se han realizado investigaciones referentes a estas cepas de *Salmonella*, como la que realizaron Medrano-Félix y colaboradores (2018), al caracterizar y evaluar la formación de biopelícula en una interfase líquido-aire y en condiciones estresantes de pH y salinidad, simulando un ambiente acuático. Para ello, se analizaron dos cepas ambientales y dos cepas aisladas de heces de animales domésticos, en la cual, se resalta a *S.* Oranienburg S-76 (ambiental) que mostró un morfotipo rugoso incompleto, designado como BDAR que involucra una película delgada y baja hidrofobicidad, aunque con una mejor formación de biopelícula, mayor motilidad y resistencia a la

tensión que su homólogo clínico aislado de heces. En este último parámetro no se observaron diferencias significativas con el serotipo control *S. Typhimurium* ATCC DT104.

El anunciamiento del genoma de *Salmonella* S-76 realizado por Medrano-Felix y colaboradores (2013), secuenciado en la plataforma Ion Torrent Personal Genome Machine, permitió identificar el contenido genético relacionado con la respuesta al estrés, transporte, metabolismo y otros, ya que esta información daría soporte a los estudios publicados por Medrano-Felix y colaboradores (2017), y Estrada-Acosta y colaboradores (2018). Las diferencias en la utilización de fuentes de carbono de aislados de agua de río de *Salmonella*, en la que se concluye que las cepas ambientales mostraron una mejor habilidad de utilización de nutrientes bajo tres diferentes condiciones de crecimiento (laboratorio, agua de río y línea celular HEP-2) que el control *S. Typhimurium* 14028s, resaltando al serotipo Oranienburg (S-76) como el más rápido y con una alta utilización de estos recursos (Medrano-Felix y colaboradores 2017). La adherencia y la capacidad invasiva de cepas aisladas de ambientes no hospederos expuestas a condiciones de laboratorio y agua de río para ser inoculadas en células HEP-2 fue evaluada (Estrada-Acosta y colaboradores 2018). Los resultados obtenidos muestran una menor habilidad de invasión y adherencia por parte de las cepas ambientales en comparación con el control, sin embargo, la capacidad de adhesión de *S. Oranienburg* S-76 no fue afectada por el cambio de condición de crecimiento, pero sí la capacidad de invasión. Con el genoma secuenciado de S-76 también se buscaron genes involucrados con la patogenicidad (virulencia, motilidad, regulación y respuesta al estrés), con una mayor cantidad de genes en esta cepa, 12 de virulencia, 7 de motilidad y 9 de respuesta al estrés, y solo 33 genes menos en comparación con el genoma de *S. Typhimurium* 14028s (control).

La capacidad de adhesión e invasión en células Caco-2 y la supervivencia en macrófagos RAW 264.7 se evaluó entre el serotipo clínico *S. Oranienburg* S-347 y el ambiental S-76 (Ramírez y colaboradores 2018). La cepa S-347 presentó mayor adherencia, pero menor invasividad a las células en comparación con el aislado ambiental. La letalidad en las células epiteliales entre serotipos ambientales y clínicos no presentó diferencias significativas. La mayor viabilidad de bacterias dentro de los macrófagos la presentó la cepa S-76 en comparación con S-347. Se llegó a la conclusión de que las diferentes respuestas detectadas entre aislados ambientales y clínicos se puede deber al origen de aislamiento, pudiendo afectar la interacción con el hospedero.

El estudio más reciente sobre *Salmonella* Oranienburg, consistió en la caracterización del proceso de formación de biopelículas como estrategia de supervivencia en ambientes no hospederos,

llevado a cabo por Contreras-Soto y colaboradores (2021), donde caracterizaron la composición de las biopelículas formadas por serotipos de *Salmonella*, incluyendo cepas del serotipo Oranienburg de origen ambiental y clínico (S-76 y S-347, respectivamente). Los análisis realizados comprendieron la exposición a los escenarios de laboratorio y río dentro de cápsulas. El morfotipo de las cepas de *S. Oranienburg* tanto clínica como ambiental fue el descrito como SPAM (suave, rosado y mucoide), un morfotipo reportado por primera vez en el trabajo antes mencionado. La formación de biopelícula de S-76 en la interfaz líquido-aire fue calificada como fuerte en comparación S-347. Así mismo, la resistencia a la tensión fue superior en S-76 y nula para la cepa clínica. En el ensayo de motilidad, la exposición al río no afectó este parámetro, excepto en S-347 que disminuyó, a diferencia de S-76 con una motilidad superior en cualquier escenario. Algunos componentes principales de las biopelículas como la proteína Curli y la celulosa, se encontraron en todas las películas bacterianas. La celulosa se encontró en mayor proporción en las cepas ambientales y el control *S. Typhimurium* 14028s. En la cuantificación de proteína total, relacionada con Curli, se pudo hacer una diferenciación entre serotipos (Oranienburg, Typhimurium e Infantis), obteniendo que el serotipo Oranienburg contó con el mayor porcentaje en este tipo de componentes. Por último, la caracterización de los azúcares en las biopelículas arrojó una alta cantidad de manosa en los dos aislados Oranienburg expuestos a los dos escenarios y estudiado también en el estado planctónico. El monosacárido ribosa se encontró en todas las cepas. Se concluyó que los aislados ambientales presentan mayor habilidad para la formación de biopelícula después de una exposición al agua de río, las características morfológicas y físicas muestran diferencias intra-serotipos, la composición de las biopelículas guardaron una relación serotipo independiente y la exposición en cuerpos de agua potencia la habilidad de desarrollar películas bacterianas.

Podemos resaltar con estas investigaciones que los aislados de origen ambiental están mayormente capacitados para hacer uso de diversas fuentes de carbono (Medrano-Felix y colaboradores 2017) y de la producción de biopelículas más fuertes (Medrano-Félix y colaboradores 2018). Los aislados clínicos, por su parte, presentan regularmente mejores habilidades para invadir y adherirse, aunque se han visto afectados por las exposiciones a entornos no hospederos y en la formación de películas bacterianas (Estrada-Acosta y colaboradores 2018). Otro aspecto en las cepas ambientales es su viabilidad patogénica que les ha dado en ocasiones mayor capacidad de invasión y propagación en células epiteliales y macrófagos respectivamente, sugiriendo que el ciclo de infección puede continuar a pesar de pasar por un medio ambiente estresante y diferente al encontrado en el

hospedero (Ramírez y colaboradores 2018).

Con base en los estudios previamente realizados, así como de las áreas de oportunidad y nuevas hipótesis de estudio generadas, surge el presente trabajo de investigación, que pretende estudiar con mayor profundidad los genomas de estas dos cepas (S-76 y S-347) de diferente origen de aislamiento como apoyo de comparación, para complementar los aspectos obtenidos del comportamiento de este patógeno, haciendo uso del material genético obtenido por nuevas plataformas de secuenciación, programas especializados en la búsqueda de genes, visualización y comparación del material genético para su interpretación y llegar a la comprensión de fenómenos mostrados fenotípicamente o la posible predicción de otros aun no estudiados. Además del estudio del perfil a antimicrobianos de los dos aislados.

3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La cepa de *S. Oranienburg* S-347 de origen clínico presentará mayor contenido genético relacionado a la patogenicidad (virulencia, resistencia antimicrobiana y capacidad de formación de biopelícula) que la cepa de *S. Oranienburg* S-76 de origen ambiental.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar e integrar las características genotípicas y fenotípicas involucradas en la patogenicidad de *Salmonella* Oranienburg de origen clínico y ambiental.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el perfil de resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* Oranienburg de origen clínico (S-347) y ambiental (S-76).
- Caracterizar el contenido genético involucrado en la resistencia a antimicrobianos, virulencia y capacidad de formación de biopelículas presente en la secuencia nucleotídica de *S. Oranienburg* S-347 y S-76.
- Integrar el análisis genómico con la información generada del perfil de resistencia a antimicrobianos, virulencia y capacidad de formación de biopelículas de *S. Oranienburg* S-347 y S-76.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Coordinación Culiacán (CIAD).

5.1. Reactivación Bacteriana

Para este estudio se utilizaron dos cepas bacterianas pertenecientes al cepario de LANIIA, *S. Oranienburg* S-76 de origen ambiental (Jiménez y colaboradores 2014), y *S. Oranienburg* S-347 de origen clínico (Vázquez-Garcidueñas y colaboradores 2014), y una cepa clínica de referencia ATCC, *S. Typhimurium* 14028s (en adelante ST14028s) (Jarvik y colaboradores 2010). Las cepas previamente almacenadas en viales de preservación criogénica a -80 °C se reactivaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Microbank, ProLab Diagnostics, U.S.A). Una vez reactivadas, las cepas bacterianas se inocularon simultáneamente en 10 mL de caldo de soya tripticaseína (TSB) (BD Bioxón, México) y en cajas Petri con agar selectivo XLD (agar de xilosa, lisina, desoxicolato) (BD Bioxón, México) mediante estriado con ayuda de un asa de nicromo estéril e incubadas a 37 °C por 24 h en condiciones aeróbicas (Shel-lab, U.S.A). La inoculación en agar XLD se realizó para comprobar la pureza de los viales de cada bacteria y el crecimiento típico de *Salmonella* descrito por el fabricante (colonias con centro negro y halo transparente).

5.2. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana

La prueba de susceptibilidad se realizó mediante el método de difusión de disco en agar, conocido como Kirby-Bauer, siguiendo las recomendaciones del documento M100 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) (CLSI, 2017). Las cepas

crecidas previamente en caldo TSB se sembraron en agar no selectivo de soya tripticaseína (TSA) (BD Bioxón, México) e incubadas a 37 °C por 24 h. Para esta determinación se utilizaron 22 antimicrobianos en discos (Sensi-Discs, BD BBL, México) descritos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Antimicrobianos utilizados en el ensayo de susceptibilidad antimicrobiana categorizados por clase, contenido y categorías de susceptibilidad para cada uno.

Clase	Antimicrobiano	Contenido (µg)	R (mm)	I (mm)	S (mm)
Penicilinas β-lactámicos/β- lactamasas	Ampicilina	10	≤13	14-16	≥17
	Amoxicilina-ac. Clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18
	Ampicilina- sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15
	Piperacilina- tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21
Cefalosporinas	Cefazolina	30	≤19	20-22	≥23
	Cefepime	30	≤18	19-24	≥25
	Ceftriaxona	30	≤19	20-22	≥23
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18
	Cefuroxima	30	≤14	15-17	≥18
	Ceftazidima	30	≤17	18-20	≥21
Monobactamas	Aztreonam	30	≤17	18-20	≥21
Carbapenémicos	Ertapenem	10	≤18	19-21	≥22
	Imipenem	10	≤19	20-22	≥23
	Meropenem	10	≤19	20-22	≥23
	Aminoglucósidos	Gentamicina	10	≤12	13-14
	Tobramicina	10	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17
Tetraciclinas	Tetraciclina	30	≤11	12-14	≥15
Quinolonas	Ciprofloxacina	5	≤20	21-30	≥31
Inhibidores de la ruta folato (sulfonamidas)	Trimetoprima- sulfametoxazol	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
Fenicoles	Cloranfenicol	30	≤12	13-17	≥18

µg: microgramos, mm: milímetro(s). R: resistente, I: intermedio, S: susceptible.

Los diámetros de las zonas con inhibición se midieron con un lector automático de zonas de inhibición (Scan 1200, Interscience, U.S.A.) y con un calibrador digital (Vernier) para corroborar las lecturas del lector automático. Se generaron tres réplicas para cada antibiótico y las mediciones

obtenidas para cada disco en milímetros se interpretaron utilizando los criterios de susceptibilidad para enterobacterias que se encuentran en el documento M100-S27 (CLSI, 2017), clasificándose en resistentes, intermedias o susceptibles. *Escherichia coli* ATCC 25922 fue utilizada como modelo para el control de calidad interno establecido por el método.

5.3. Extracción de ADN

La extracción del ADN de ambas bacterias se realizó mediante lisis celular por alta temperatura, siguiendo la metodología de Aldous y colaboradores (2005), con algunas modificaciones. Una colonia de *Salmonella* de cada cepa en estudio proveniente de una placa de agar XLD se inoculó en agar TSA para su incubación durante la noche a 37 °C en un ambiente aerobio. Transcurrido el tiempo, se tomó un grupo de colonias de *Salmonella* en agar TSA y se colocaron en 1 mL de agua destilada estéril en un tubo de 1.5 mL (Eppendorf, Alemania) para ser centrifugadas a 13,000 RPM por 10 min; el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 200 µL de agua destilada estéril y se llevó a un termobloque a 100 °C durante 10 min e inmediatamente enfriado en el mismo termobloque. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 10,000 RPM por 10 min y el sobrenadante fue recolectado en un tubo nuevo de 1.5 mL (Eppendorf, Alemania). La concentración y pureza del ADN se evaluaron mediante densidad óptica utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA), bajo las recomendaciones del fabricante para los índices de pureza A260/A280 con valores aproximados a 1.8 y A260/A230 con un rango de 1.8-2.2 para considerar una muestra de ácido nucleico “pura”. Finalmente, cada tubo se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

5.4. Ensamble de Genomas

La secuenciación de los genomas se llevó a cabo en el Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona, España, en la plataforma de Illumina MiSeq (Illumina,

San Diego, CA), utilizando el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA), para generar la librería de secuenciación. Una vez obtenidas las lecturas de las secuencias genómicas, se utilizó la herramienta Trimmomatic versión 0.36 (Bolger y colaboradores 2014), para la remoción de fragmentos con baja calidad y la eliminación de secuencias correspondientes a adaptadores en ambos genomas. Después de este paso, cada genoma fue ensamblado por el método *de novo* con el programa A5-miseq v20160825 (Coil y colaboradores 2015).

5.5. Anotación de Genomas y Genoserotipificación

Los genomas ensamblados fueron anotados mediante el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz y colaboradores 2008; Overbeek y colaboradores 2014), con el esquema de anotación ClassicRAST, y la herramienta Prokka v1.13.7 (Seemann, 2014), con parámetros por defecto para ambas herramientas. El serotipo fue confirmado *in silico* por el programa SISTR (*Salmonella in silico* Typing Resource), que integra tipificación por métodos de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), MLST ribosomal (rMLST) y genoma núcleo (cMLST), analizando los genes *wzx* y *wzy* altamente variables de la región *rfb* que determina el antígeno somático (O), y los genes *fliC* y *fliB* para determinar los antígenos flagelares alternativos (fase 1 y 2 del antígeno H) para buscar finalmente en la base de datos de serovariedades de White-Kauffmann-Le Minor el nombre de la serovariedad. Para el análisis del genoma central (cgMLST) se analizan 330 locus en busca del serotipo más probable de la lista de serotipos potenciales, y finalmente para la serotipificación MLST, se tipifican siete fragmentos de genes de mantenimiento (Yoshida y colaboradores 2016).

5.6. Identificación de Genes Específicos e Islas de Patogenicidad

Para esta actividad, se utilizó el programa ABRicate v1.0.0 (<https://github.com/tseemann/abricate>), utilizando un criterio de inclusión para genes presentes de cobertura e identidad mínima del 90 %,

así como múltiples bases de datos, incluyendo a VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria Database) para genes de virulencia, CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) y MEGARes v2.0 para genes de resistencia a antibióticos, metales y biocidas, y la base de datos PlasmidFinder para la identificación de replicones de plásmidos. También se hizo uso de la herramienta en línea ResFinder 4.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), para la búsqueda de genes AMR, y de la herramienta que ésta integra, PointFinder, para la identificación de mutaciones puntuales en el cromosoma que median este tipo de resistencia. ResFinder 4.0 generó antibiogramas *in silico* e identificó genes AMR con límites mínimos de 90 % para identidad y 80 % para la cobertura en esta investigación. La información detallada del número de secuencias que contiene cada base de datos está en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Base de datos con número de secuencias contenidas en cada una, utilizadas en la búsqueda de genes AMR, mutaciones puntuales en cromosoma, genes de virulencia y replicones de plásmidos presentes en los genomas S-76 y S-347.

Base de datos	Secuencias	Fecha de última actualización	Fuente
CARD	2,631	2020-Abr-16	(Jia y colaboradores 2017)
ResFinder 4.0	2,690	2020-Abr-16	(Bortolaia y colaboradores 2020)
PointFinder	266	2019-Ago-28	(Bortolaia y colaboradores 2020)
MEGARes	6,635	2020-Abr-16	(Doster y colaboradores 2020)
VFDB	3,226	2020-Abr-16	(Chen y colaboradores 2016)
PlasmidFinder	468	2020-Abr-16	(Carattoli y colaboradores 2014)

Las islas de patogenicidad fueron identificadas mediante la herramienta NCBI-BLASTn en línea (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), haciendo uso del genoma de interés y de un archivo “multifasta” como base de datos de SPIs reportadas, con los parámetros predeterminados por el programa para posteriormente filtrar los resultados positivos que cumplan mínimamente una cobertura del 65 % y una identidad del 95 %. Para ello, se recolectaron las secuencias nucleotídicas de las SPIs reportadas en genomas pertenecientes a cinco serotipos de *Salmonella* (Cuadro 4) y alojadas en la base de datos PAIDB (Pathogenicity Island Database) (Yoon y colaboradores 2015). Enseguida, se preparó un archivo multifasta con las secuencias previamente obtenidas, las cuales

se utilizaron en el programa NCBI-BLASTn y para su visualización el programa BRIG (BLAST Ring Image Generator Software) v0.95 (Alikhan y colaboradores 2011), contra los genomas de *S. Oranienburg* S-76 y S-347.

Cuadro 4. Contenido de la base de datos utilizada para la construcción de las SPIs de S-76 y S-347.

Serotipo	No. De acceso	SPIs
<i>S. Typhimurium</i> 14028s	NC_016856.1	1-6, 11, 12, CS54
<i>S. Typhimurium</i> LT2	NC_003197	1-5
<i>S. Typhi</i> CT18	NC_003198	1-10
<i>S. Typhi</i> Ty2	NC_004631.1	1, 2, 7
<i>S. Choleraesuis</i> SC-B67	NC_006905.1	1-5, 11, 12

5.7. Determinación de Genes Únicos

La búsqueda de genes únicos entre las dos cepas de *S. Oranienburg* (S-76 y S-347) se determinó siguiendo la metodología del programa Roary (Page y colaboradores 2015), y con el uso de los archivos con formato (.gff) que derivaron de la anotación con Prokka, con el objetivo de obtener los genes que solo están contenidos en cada genoma y que diferencien a una cepa de la otra.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Perfil de Resistencia a Antimicrobianos

En el ensayo para la determinación del perfil de AMR mediante el método de difusión en disco, las dos cepas de *S. Oranienburg* (S-76 y S-347) y *S. Typhimurium* ST14028s (cepa clínica de referencia) presentaron un perfil totalmente susceptible a los 22 antibióticos probados en esta investigación, esto debido a que el tamaño de los halos de inhibición superó el crecimiento bacteriano, estableciendo a las cepas en el rango de susceptibles, establecido por el método (Cuadro 5 y Figura 3, 4 y 5). En el Cuadro 5, se pueden observar las mediciones de los halos de inhibición para cada cepa y antibiótico. Estas mediciones provienen de promediar tres réplicas y se indica su desviación estándar, ya que esta es una medida de dispersión que indica que tan alejados están los datos de la media o promedio, motivo por el cual fue utilizado a fin de identificar si existen diferencias en los halos a pesar de pertenecer a la misma categoría.

Cuadro 5. Promedio de las mediciones de halos de inhibición para S-76, S-347 y ST14028s en la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos.

Antimicrobiano	Contenido (µg)	Rango de susceptibilidad de <i>Enterobacteriaceae</i> (mm)	Zonas de inhibición (mm)		
			S-76	S-347	ST14028s
Ampicilina	10	≥17	20.7 ±1.2	21.0 ±1.0	20.6^a ±1.6 ^b
Amoxicilina-ac. Clavulánico	20/10	≥18	25.3 ±1.3	23.6 ±1.8	25.0 ±0.4
Ampicilina-sulbactam	10/10	≥15	22.5 ±1.3	21.4 ±2.1	23.5 ±1.5
Tazobactam-piperacilina	100/10	≥21	24.2 ±1.6	24.3 ±1.2	24.4 ±1.3
Cefazolina	30	≥23	23.4 ±0.5	23.3 ±0.8	24.5 ±0.3
Cefepime	30	≥25	29.1 ±2.7	27.7 ±2.5	30.8 ±3.2
Ceftriaxona	30	≥23	25.4 ±1.2	25.3 ±0.8	27.0 ±2.2
Cefotetan	30	≥16	26.0 ±0.9	28.3 ±2.1	28.6 ±1.0
Cefoxitina	30	≥18	21.9 ±1.3	22.7 ±1.1	25.4 ±1.2
Cefuroxima	30	≥18	19.3 ±1.3	18.8 ±1.1	19.8 ±0.9

Ceftazidima	30	≥ 21	23.3 \pm 1.6	23.0 \pm 1.2	24.3 \pm 2.8
Aztreonam	30	≥ 21	26.6 \pm 1.5	26.0 \pm 2.5	27.3 \pm 3.5
Ertapenem	10	≥ 22	29.7 \pm 0.6	28.9 \pm 3.2	30.7 \pm 1.5
Imipenem	10	≥ 23	24.7 \pm 1.5	26.7 \pm 1.9	27.5 \pm 1.6
Meropenem	10	≥ 23	27.7 \pm 3.1	28.3 \pm 2.0	30.5 \pm 1.9
Gentamicina	10	≥ 15	22.6 \pm 2.3	21.9 \pm 2.3	21.9 \pm 1.3
Tobramicina	10	≥ 15	19.7 \pm 1.4	20.1 \pm 1.3	21.1 \pm 1.0
Amikacina	30	≥ 17	21.4 \pm 1.2	22.3 \pm 1.9	22.3 \pm 2.4
Tetraciclina	30	≥ 15	21.4 \pm 0.6	21.3 \pm 0.8	22.2 \pm 1.9
Ciprofloxacina	5	≥ 31	31.6 \pm 0.6	30.7 \pm 0.6	31.2 \pm 3.1
Trimetoprima-sulfametoxazol	1.25/23.75	≥ 16	25.7 \pm 1.9	25.9 \pm 0.3	25.7 \pm 1.0
Cloranfenicol	30	≥ 18	22.7 \pm 1.3	22.0 \pm 1.2	24.5 \pm 2.5

a: valor menor (resaltado en negrita) entre las tres bacterias tomando en cuenta un antibiótico. b: valor de la desviación estándar.

En comparación, la cepa S-347 mostró mayor número de halos de inhibición de menor medida en al menos 12 de los antibióticos evaluados (resaltados en negritas), en comparación con S-76 y ST14028s, lo que puede indicar probablemente una menor afectación por los antibióticos en este ensayo por difusión de disco seguido por S-76, sin embargo, esta afirmación no se puede asegurar sin mayores estudios experimentales con otras metodologías cuantitativas.

En estudios previos se ha evaluado la AMR de aislados de la misma región y origen que S-76, donde el 50 % de los aislados de *Salmonella* fueron susceptibles a los seis antimicrobianos evaluados, ampicilina (10 μ g), ciprofloxacino (5 μ g), trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75 μ g), tetraciclina (30 μ g), estreptomina (10 μ g) y gentamicina (10 μ g) (López-Cuevas y colaboradores 2009). En un estudio posterior, el 49.5 % de los aislados resultó susceptible a un grupo de 16 antibióticos, dentro del cual ocho de ellos coinciden con los utilizados en la presente investigación (gentamicina, ampicilina, amikacina, amoxicilina-ácido clavulánico, ceftazidima, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina) (Castañeda-Ruelas y Jiménez, 2018). Esto permite sugerir que en los sitios de aislamiento mencionados no existe un alto porcentaje de cepas resistentes o multirresistentes a antibióticos que exceda a más de la mitad de las muestras positivas obtenidas, en este caso de ríos del Valle de Culiacán. Coincidentemente, la cepa S-76 evaluada en el presente estudio, fue aislada de la misma región de estudio que los trabajos anteriormente descritos (Jiménez y colaboradores 2014).

En este estudio se utilizaron antibióticos recomendados por el CLSI para la familia *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017), dentro de los que se encuentran los antibióticos ciprofloxacino y ceftriaxona, recomendados en México para el tratamiento de la diarrea aguda tanto para infantes de 2 meses a 5 años (CENETEC, 2018), como para adultos (CENETEC, 2020), respectivamente. Los halos de inhibición producidos por estos dos antibióticos se muestran a continuación, para S-76 (Figura 3), S-347 (Figura 4) y ST14028s (Figura 5).

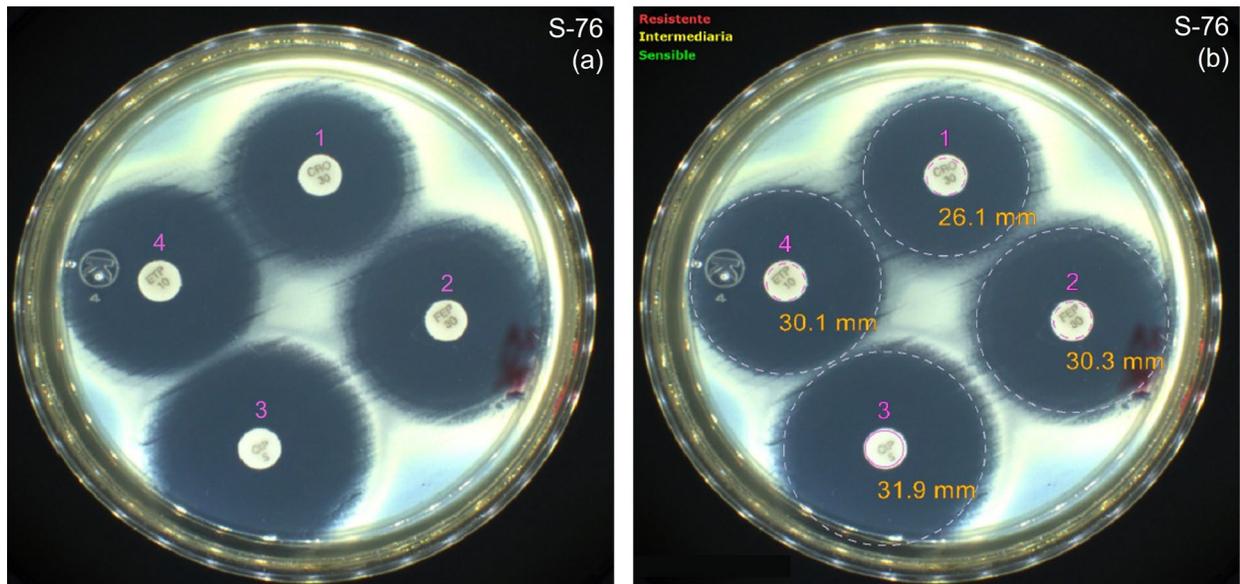


Figura 3. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para S-76, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ceftriaxona, (2) cefepime, (3) ciprofloxacino y (4) ertapenem.

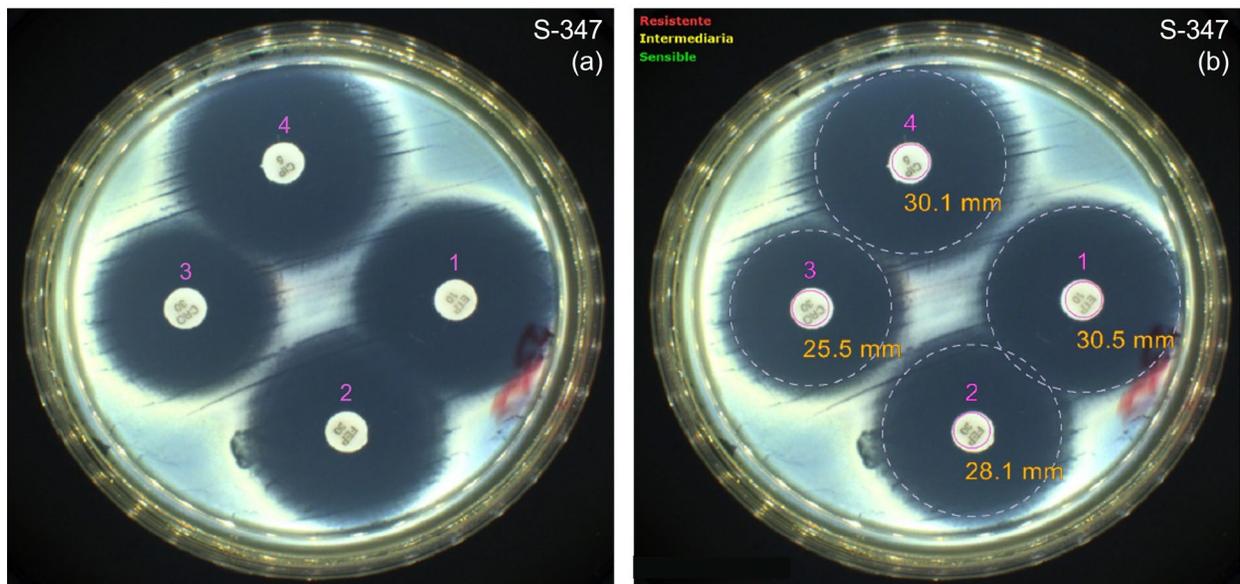


Figura 4. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para S-347, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ertapenem, (2) cefepime, (3) ceftriaxona y (4) ciprofloxacino.

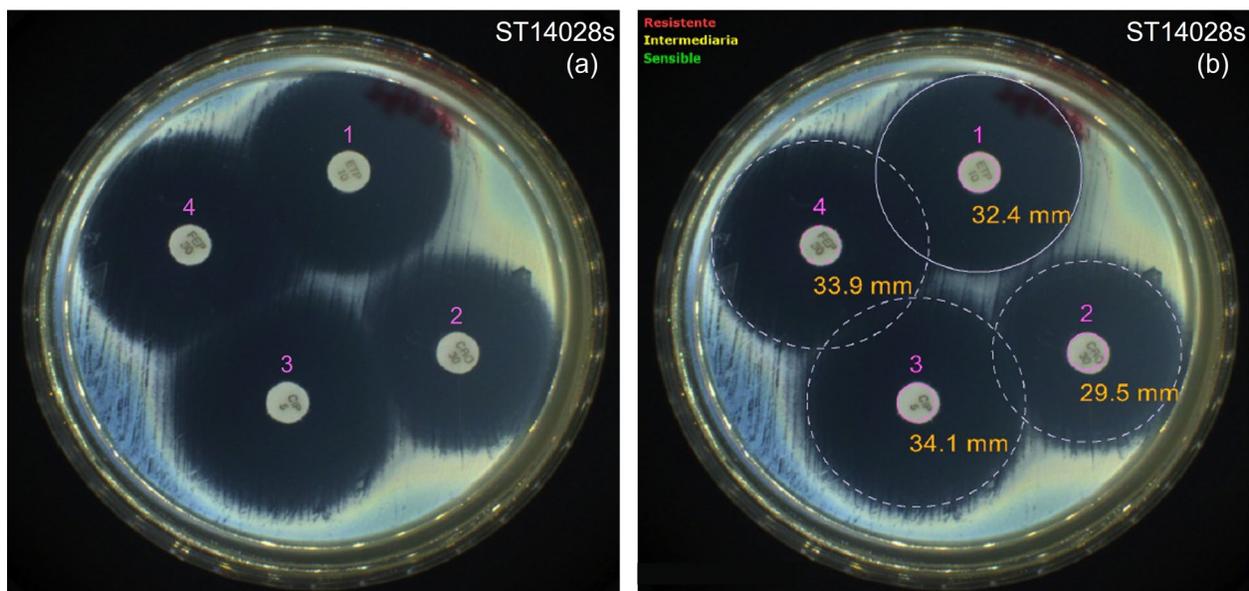


Figura 5. Lectura de halos de inhibición de la prueba de resistencia a antimicrobianos para ST14028s, (a) sin medición del halo de inhibición; (b) mediciones de los halos de inhibición de los antibióticos (1) ertapenem, (2) ceftriaxona, (3) ciprofloxacino y (4) cefepime.

Recientemente, Garza-Gonzalez y colaboradores (2019), documentaron las tasas de AMR de 22,943 cepas de bacterias patógenas (incluyendo a *Salmonella* y a otros géneros) recolectadas de

47 centros (39 laboratorios hospitalarios y 8 laboratorios externos) de 20 estados en México durante seis meses, concluyendo una baja tasa de resistencia (no mayor a 28 %) a los antibióticos usados normalmente por esos centros para determinar la susceptibilidad de los aislados bacterianos. Resultados similares obtuvieron, al analizar 243 aislados de *Salmonella* obtenidos de productos de origen animal y de casos clínicos del Estado de México y Jalisco, con menos del 25 % de AMR para siete de los ocho antimicrobianos que utilizaron en el ensayo de susceptibilidad.

6.2. Secuenciación, Anotación y Genoserotipificación de los Genomas

6.2.1. *S. Oranienburg* S-76

De la secuenciación de la cepa S-76, se obtuvo una longitud de cromosoma de 4,619,879 pb. Los resultados de la anotación con RAST mostraron 4,498 secuencias codificantes (CDS), 111 ARNs integrados por ARNs de transferencia (79) y ribosomales (32), y un contenido G+C de 52.1 % (Cuadro 6). Además de obtener información relevante de las CDS, el servidor RAST agrupa los conjuntos de genes o regiones codificantes en subsistemas que comparten roles funcionales similares, con lo cual se obtuvo un agrupamiento de 575 subsistemas en este caso (Figura 6).

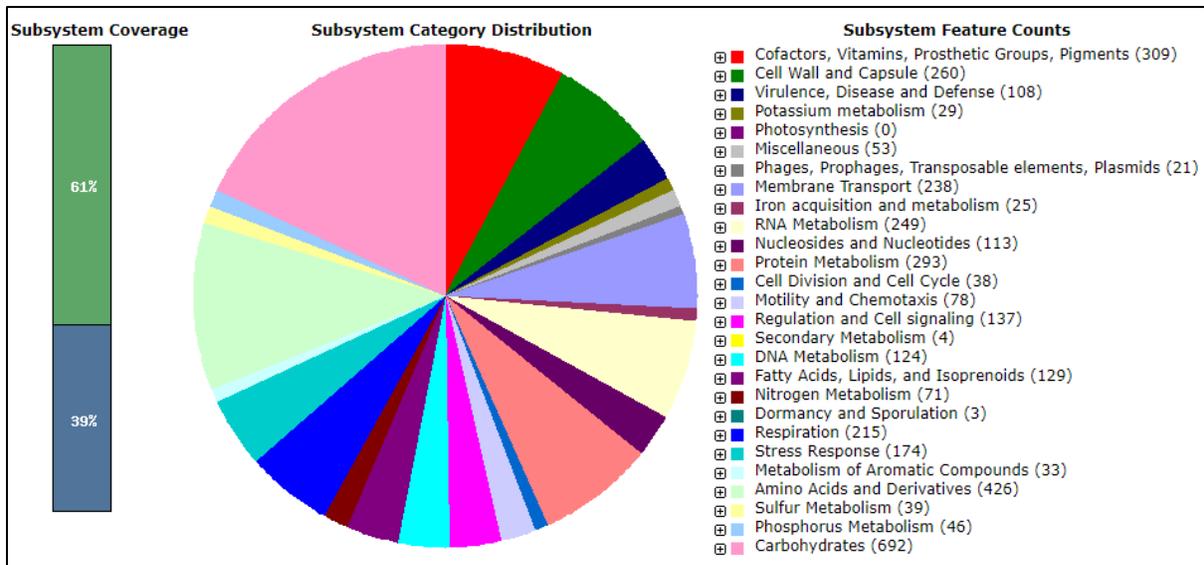


Figura 6. Contenido genético de S-76 agrupado en subsistemas por RAST.

La secuenciación de S-76, que se llevó a cabo con la plataforma Illumina pudo alcanzar una profundidad media de cobertura de 96x, esto se refiere al número de lecturas únicas de un solo nucleótido que apoyan la lectura obtenida en la secuencia reconstruida. Medrano-Felix y colaboradores (2013), ya habían secuenciado a la cepa S-76 en la plataforma Ion Torrent Personal Machine, pero con una profundidad media de cobertura de 35.8x, esto y otras diferencias se deben a la naturaleza de cada secuenciador, programas utilizados para ensamblar y limpieza de las secuencias obtenidas, por lo que se puede considerar a la secuenciación con Illumina como una actualización en tecnología y complementación de la información de esta cepa. Sin embargo, los dos datos de cobertura obtenidos son aceptables para la anotación de genomas, y están dentro de los usados para la búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido que requieren que no existan errores en una lectura de cada nucleótido (Desvillechabrol y colaboradores 2018).

Cuadro 6. Información genética de la secuenciación de las cepas de S-347 y S-76.

Aislado	Longitud (pb)	No. de contigs	N50	Contenido GC (%)	Secuencias codificantes	Profundidad media de cobertura (x)
S-347	5,055,359	133	622,583	51.9	5,087	105
S-76	4,619,879	38	566,681	52.1	4,498	96

6.2.2. *S. Oranienburg* S-347

Se obtuvo un tamaño de genoma de 5,055,359 pb para la cepa S-347 y una profundidad media de cobertura de 105x. Mediante el servidor RAST 5,087 CDS, 101 ARNs integrados por ARNs de transferencia (84) y ribosomales (17), y 51.9 % en contenido G+C (Cuadro 6), así como un agrupamiento de 580 subsistemas (Figura 7).

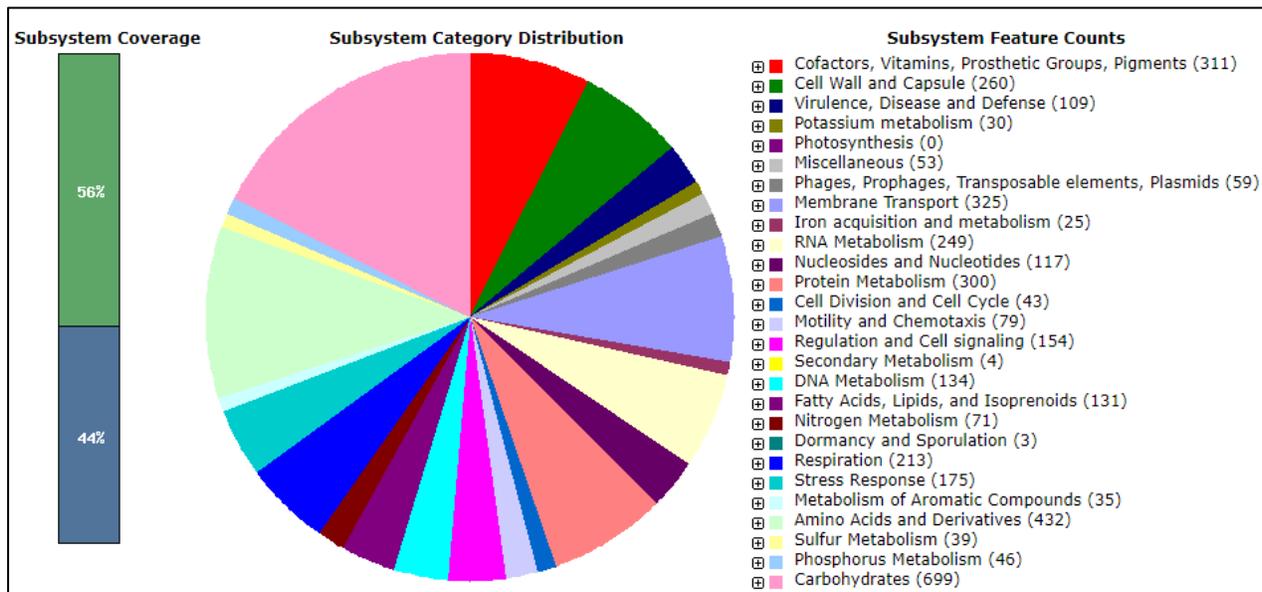


Figura 7. Contenido genético de S-347 agrupado en subsistemas por RAST.

Los dos genomas tienen similitud en el porcentaje de G+C (~52.0 %), mientras que las longitudes de los genomas y las CDSs varían con el tamaño del genoma de cada cepa. El subsistema que agrupa el conjunto de genes relacionado a fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos

(séptimo grupo de arriba hacia abajo) de S-347 contiene 59 regiones codificantes, 38 elementos más que S-76 con 21.

6.2.3. Genoserotipificación

La plataforma SISTR obtuvo la fórmula antigénica (C1:m,t:-) para las cepas S-76 y S-347, pertenecientes al serotipo Oranienburg. Además de la fórmula antigénica para las cepas en estudio, SISTR arrojó al serotipo Oranienburg como predominante y más probable en el análisis MLST del genoma central (cgMLST). En la serotipificación MLST, se obtuvo un Tipo de Secuencia 23 designado para *S. Oranienburg* (Cuadro 7).

Estos resultados obtenidos de la genoserotipificación para los dos aislados S-76 y S-347, coinciden con las serotipificaciones realizadas a S-76 (Jiménez y colaboradores 2014) y S-347 (Vázquez-Garcidueñas y colaboradores 2014) mediante el esquema Kauffmann-White.

Cuadro 7. Información obtenida de la genoserotipificación *in silico* con la plataforma SISTR.

Aislado	Serotipo obtenido	Antígeno O	Antígeno H1	Antígeno H2	Serotipo por cgMLST	ST por MSLT	Serotipo por MLST
S-347	Oranienburg	C1	m,t	-	Oranienburg	23	Oranienburg
S-76	Oranienburg	C1	m,t	-	Oranienburg	23	Oranienburg

6.3. Identificación de Genes Específicos y Relacionados a la Presencia de Plásmidos Presentes en los Genomas de *Salmonella*

6.3.1. Genes Relacionados con la Resistencia a Antimicrobianos

Para ambas cepas en estudio (S-76 y S-347) se encontró que cuentan con los mismos genes

relacionados con alguna resistencia (mencionados a continuación), a excepción del gen *mdtA* encontrado solamente en S-76, que forma parte de un sistema de flujo de salida tripartido compuesto por la proteína que codifica *mdtA* y dos más, MdtB y MdtC (Frawley y colaboradores 2013). Cabe recordar que un gen no encontrado, quiere decir que no superó el criterio mínimo de cobertura y/o el de identidad para ser considerado como presente en el fragmento de búsqueda, o que no se encuentra en su totalidad. Para este propósito se utilizaron las bases de datos CARD y MEGARes por medio del programa ABRicate. Otros dos genes codificantes de proteínas compartidos en los dos genomas son *golS* y *sdiA*, que promueven la expresión del operón *mdsABC* para una bomba de eflujo (encontrado en ambos genomas) y también la expresión de las subunidades AcrAB de un complejo de proteínas de eflujo o bomba (Nikaido y colaboradores 2008; Song y colaboradores 2015).

Además, el análisis mostró la presencia de dos genes relacionados con bombas de eflujo, *acrD* y *mdtK*, y de dos proteínas (BaeS/BaeR) formadoras de un sistema regulador que puede activar al sistema MdtABC mencionado anteriormente, relacionado con la resistencia a novobiocina y desoxicolato (Nikaido y colaboradores 2008). Por último, se encontró el gen *aac(6')-Iy* (aminoglucósido N (6')-acetiltransferasa tipo 1) involucrado con la resistencia a aminoglucósidos como la amikacina y tobramicina (Magnet y colaboradores 1999).

Los genes mencionados anteriormente y que se encontraron en común en S-76 y S-347 cumplieron un criterio de 90 % de cobertura e identidad mínima con respecto a las bases de datos utilizadas para su búsqueda. Así también, se obtuvo la homología de estas dos cepas con respecto a los genes de ST14028s, ya que se conoce mejor el genoma de esta bacteria y se puede utilizar como referencia. La comparación de los genes arrojó una alta conservación de estos con los de ST14028s, obteniendo una cobertura de 100 % y un porcentaje de identidad de al menos 97.7 % (Cuadro 8).

Cuadro 8. Homología de genes relacionados con resistencia a antimicrobianos presentes en los genomas de las cepas S-76 y S-347 comparados con los genes de ST14028s.

Genes de resistencia	Homología con ST14028s	
	S-76	S-347
<i>aac(6')-Iy</i>	97.7 ^a	97.7
<i>sdiA</i>	98.75	98.48
<i>mdsA</i>	98.86	98.86
<i>mdsB</i>	98.99	98.99

<i>mdsC</i>	98.35	98.41
<i>golS</i>	99.36	99.36
<i>mdtK</i>	98.73	98.73
<i>mdtA</i>	99.28	N/P ^b
<i>mdtB</i>	98.81	98.81
<i>mdtC</i>	98.86	98.9
<i>baeR</i>	99.31	99.45
<i>baeS</i>	98.65	98.65
<i>acrD</i>	98.68	98.68
<i>pmrG</i>	98.68	98.68

a: porcentaje de identidad al gen de la cepa ST1828s. b: no presente.

Los resultados obtenidos con ResFinder 4.0 mostraron como único gen AMR presente a *aac(6')-Iaa* (NC_003197) en los tres genomas con una cobertura de 100 % e identidades de 99.77 % y 97.95 % para ST14028s y los dos aislados Oranienburg, respectivamente. El antibiograma *in silico* arrojó solo dos fenotipos de resistencia para los antibióticos amikacina y tobramicina para las tres cepas, identificando al gen anteriormente mencionado como el responsable de esta resistencia predicha en un repertorio de 23 antibióticos indicados para el género *Salmonella*. Los genes *aac(6')-Iaa* y *aac(6')-Iy* son comunes en *Salmonella* y son considerados genes crípticos, ya que fenotípicamente no presentan resistencia debido a que han alcanzado los límites evolutivos, perdiendo algún efecto benéfico por casi cualquier mutación que puedan presentar (Leon y colaboradores 2018; Salipante y Hall, 2003).

PointFinder encontró una mutación puntual cromosómica en las dos cepas de *S. Oranienburg* en el gen *parC* del tipo Thr57-Ser (Treonina por Serina), debido a un cambio de nucleótido en el codón 57 de este gen, dando un fenotipo presuntivo de resistencia al ácido nalidíxico y a ciprofloxacino (Cuadro 9). Sin embargo, Eaves y colaboradores (2004), documentaron que esta mutación en *parC* hacía a los aislados más susceptibles a ciprofloxacino, cloranfenicol y tetraciclina que aquellos sin esta mutación, pero no así al ácido nalidíxico, como si fuera una compensación.

Cuadro 9. Mutación cromosómica relacionada con resistencia a antimicrobianos encontrada en el genoma de S-76 y de S-347.

Mutación	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Fenotipo	PMID	Clase de antibiótico
parC : T57S	aac > agc	Treonina > Serina	Ácido nalidíxico, ciprofloxacino	15388468	Fluoroquinolonas

6.3.2. Identificación de Plásmidos

La identificación de plásmidos en los genomas fue llevada a cabo con la herramienta bioinformática PlasmidFinder, encontrando un replicón homólogo de plásmido del tipo IncFII(S) en la secuencia nucleotídica de la cepa S-347 con una cobertura de 97.71 % y una identidad de 91.95 % con respecto al plásmido reportado en *S. Paratyphi C*, serotipo RKS4594 (número de acceso CP000858), contenido en la base de datos de PlasmidFinder. El replicón de *S. Paratyphi C* RKS4594 tiene una longitud de 262 pb, por lo que la sección cubierta por S-347 fue de 256 pb de longitud. Esta región llamada replicón, es un segmento de plásmido esencial para funciones de mantenimiento, en este caso, del control de replicación de éste, y es utilizado como método de identificación y clasificación de plásmidos (Couturier y colaboradores 1988). Sin embargo, esta herramienta no los ensambla y solo da indicio de que existe putativamente un plásmido, para posteriormente aplicar metodologías especializadas en la identificación y aislamiento de éstos por PCR y/o complementadas con flujos de trabajos de programas específicos para esta tarea (de Toro y colaboradores 2020).

6.3.3. Genes Relacionados con la Formación de Biopelículas

La búsqueda de genes relacionados con la formación de biopelículas se realizó manualmente con las anotaciones de las herramientas RAST y Prokka, las cuales no mostraron diferencias en la presencia o ausencia de este tipo de genes de interés, ya que S-76 y S-347 cuentan con los mismos genes involucrados con la producción de biopelículas (*csgABCDEFG*, *bcsABCEFGZ*, *bapA*, *adrA*,

wcaA) descritos en la sección de antecedentes. El criterio utilizado cumplió mínimamente una cobertura del 100 % y una identidad del 97 %.

6.4. Identificación de Factores de Virulencia Presentes en los Genomas de *Salmonella*

Tras el análisis de genes relacionados con la virulencia, se encontraron 98 de éstos, los cuales fueron compartidos por las bacterias en estudio. En el Cuadro 10 se mencionan los más importantes o citados en la literatura. Sin embargo, en el análisis con la base de datos VFDB se detectaron algunos genes que fueron obtenidos para la cepa de referencia ST14028s que no aparecieron en las dos cepas de *S. Oranienburg*, tales como *avrA*, *gogB*, *grvA*, *lpfABCDE*, *pefABCD*, *pipB2*, *ratB*, *rck*, *shdA*, *sodCI*, *spvBCR*, *sseI*, *sseK2*, *sspH1* y *sspH2*, descritos a continuación.

AvrA y *SspH1* pueden inhibir la respuesta inflamatoria en una infección, aunque *AvrA* también puede reprimir la apoptosis y la respuesta inmune de la célula epitelial (Haraga y colaboradores 2008; Jones y colaboradores 2008), así como también *SpvC* puede reprimir la respuesta inmunitaria celular (Mazurkiewicz y colaboradores 2008). El gen *gogB* está involucrado en la supervivencia intracelular, mejorando la habilidad de colonización en el intestino en infecciones a corto plazo (Wahl y colaboradores 2019). El grupo de genes *lpf* son codificantes de fimbrias polares largas encargadas de la unión de *Salmonella* a las células del hospedero, así como los genes *pef* (fimbrias codificadas en plásmidos) (Chen y colaboradores 2020). PipB2 tiene la función de promover la supervivencia bacteriana en los tejidos del huésped alterando la fisiología del huésped (Henry y colaboradores 2006). Las proteínas ShdA se expresan en el intestino del hospedador y median la adhesión de *Salmonella* para una mayor persistencia (Kingsley y colaboradores 2002). SodC1 favorece el establecimiento dentro de macrófagos (Wahl y colaboradores 2019). SseI es necesaria para mantener una infección sistémica crónica a largo plazo en ratones (McLaughlin y colaboradores 2009). El gen *sseK2* está asociado con la virulencia de *Salmonella* ya que su ausencia ha estado relacionada con deficiencias en la formación de biopelícula y atenuación en la capacidad de inducir una infección sistémica (Zhang y colaboradores 2019). Las bacterias mutantes (no portadoras del gen) de *sspH2* no inducen una infección letal en experimentos realizados en terneros (Miao y colaboradores 1999).

Cuadro 10. Principales factores de virulencia presentes en los genomas de S-76, S-347 y ST14028s.

Factor de virulencia	Localización	S-76	S-347	ST14028s
<i>sipA, sipB, sipC, sptP</i>	SPI-1	+ ^a	+	+
<i>sseF, sseG, spiC, sseB, sseC, sseD</i>	SPI-2	+	+	+
<i>misL, mgtB, mgtC</i>	SPI-3	+	+	+
<i>marT</i>		- ^b	-	-
<i>sopB, sigE</i>	SPI-5	+	+	+
<i>safC, pagN</i>	SPI-6	+	+	+
<i>pagC, pagD</i>	SPI-11	-	-	-
<i>envE, envF</i>		+	+	+
<i>sspH2</i>	SPI-12	-	-	+
STM3118, STM3119	SPI-13	-	-	-
<i>loiA</i>	SPI-14	-	-	-
STM0557	SPI-16	-	-	-
<i>sopE</i>	Profago SopE	-	-	-
<i>gogB</i>	Gifsy-1	-	-	+
<i>sodC</i>	Gifsy-2	+	+	+
<i>sspH1</i>	Gifsy-3	-	-	+

a: presencia de gen en el genoma Draft. b: no presente en el Draft.

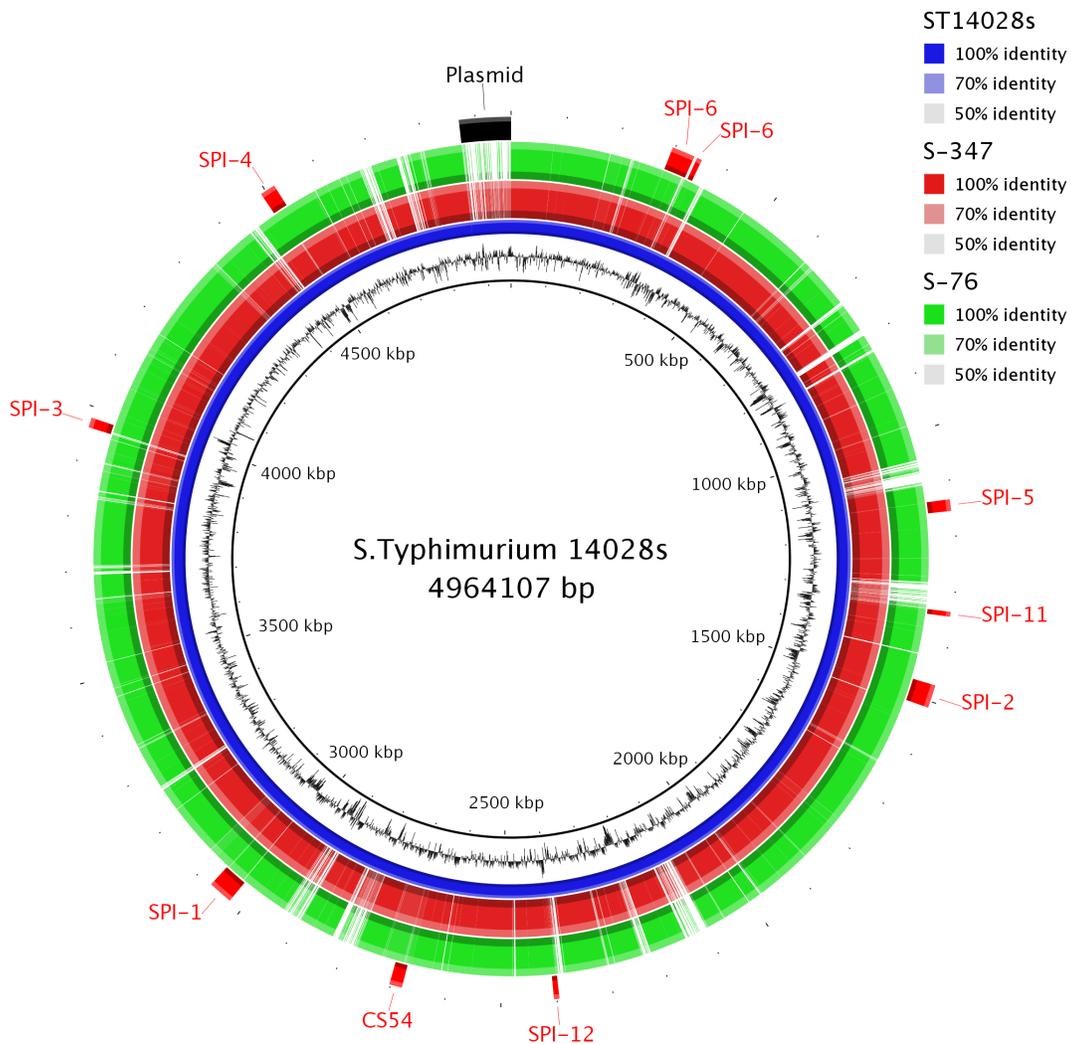


Figura 8. Genomas de S-76 y S-347 alineados con ST14028s como referencia, remarcando la localización de las SPIs y el plásmido con el que este último cuenta.

A pesar de que algunos genes marcados como factores de virulencia no están presentes en los tres aislados, se puede apreciar en la Figura 8 que, al alinearlos, todos tienen una gran parte de la SPI (3, 11 y 12), aunque con algunos espacios que no se pudieron alinear, posiblemente a la ausencia total o parcial de estos genes que no tuvieron el criterio mínimo de cobertura e identidad para que el programa que anotó los genomas los considerara como presentes. También se pueden apreciar segmentos de la cepa S-347 con más del 50 % de coincidencia con el plásmido de ST14028s, abriendo la posibilidad de la presencia de este u otro plásmido similar en S-347, sin embargo, esto debe ser respaldado por una metodología especializada en su identificación y un estudio más profundo. Este tipo de gráficos se pueden utilizar como análisis preliminares para observar el

contenido genético de fragmentos de ADN o genomas, con respecto a una referencia, por medio de un alineamiento local y se pueden agregar secciones a resaltar. En este caso es de ayuda al mostrarnos la presencia de SPIs conservadas y de una alta coincidencia entre los serotipos de *S. Oranienburg* y su separación en contenido genético del serotipo Typhimurium utilizado en esta investigación.

Para corroborar los resultados obtenidos en la Figura 8, se alinearon 35 SPIs de cinco serotipos de *Salmonella* alojadas en la base de datos PAIDB y descrito en la metodología, los cuales se alinearon a las dos cepas de *S. Oranienburg* con un mínimo de cobertura del 65 % y de identidad del 95 % apreciándose como islas identificadas en el genoma bajo este criterio (Cuadro 11). Las SPIs 1-3, 5-6, 9 y 11 se identificaron tanto en S-76 y S-347, no así las SPIs 4 y 12 que están presentes solo en S-76. Cabe resaltar que tres SPIs (7, 8 y 10) no se encontraron en el genoma de ninguna de estas dos cepas en estudio.

Cuadro 11. Identificación de SPIs en los genomas de *S. Oranienburg* S-76 y S-347.

SPIs	S-347	S-76
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	-	+
5	+	+
6	+	+
7	-	-
8	-	-
9	+	+
10	-	-
11	+	+
12	-	+

(+): SPI presente en el genoma. (-): SPI no presente en el genoma. Resultados obtenidos mediante NCBI-BLASTn.

Dentro de la SPI-4 se encuentra el gen que codifica a la proteína SiiE con una función de adhesina, secretada por un T1SS, la cual media el contacto de *Salmonella* a las células intestinales y colabora con el T3SS-1 para que la bacteria sea capaz de atravesar las barreras epiteliales (Gerlach y colaboradores 2008). Se han relacionado las deleciones en genes codificantes de SiiE con la

disminución en la adherencia en células epiteliales (Kiss *et al.*, 2007). En el caso de la SPI-12, se sabe que se requiere para una infección sistémica en ratones infectados con *Salmonella* Typhimurium (Haneda y colaboradores 2009), ya que su delección atenúa la diseminación sistémica de *Salmonella* en el hospedero (Tomljenovic-Berube y colaboradores 2013).

6.5. Determinación de Genes Únicos

Por medio del programa Roary se obtuvieron los genes que comparten los genomas de S-76 y S-347 anotados con Prokka, y los genes únicos para cada uno de ellos. Un total de 4,921 genes representan a los dos genomas anotados, sin embargo, de este total, 95 genes solo están presentes en S-76 y 641 en S-347, dejando 4,185 como un grupo de genes en común entre las dos cepas de *S. Oranienburg* (Figura 9).

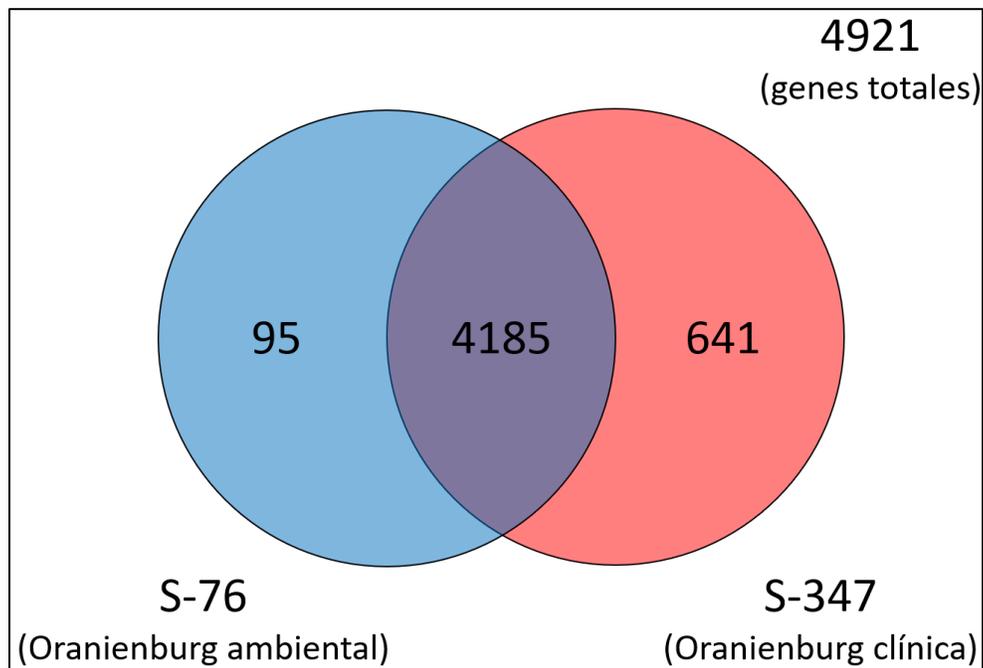


Figura 9. Diagrama de Venn con el contenido genético de S-76 y S-347. Los espacios exclusivos representan los genes únicos de un solo genoma (color azul para S-76 y color rojo para S-347). El espacio con intersección representa los genes compartidos o en común entre los dos genomas.

De los 95 genes que solo están presentes en S-76, 66 son proteínas hipotéticas, es decir, proteínas de las cuales se conoce la secuencia de aminoácidos, pero cuya función no ha sido comprobada experimentalmente, y 29 genes restantes con una función conocida. Dentro de estos 29 genes restantes, resaltan algunos como *hprR* como miembro de un sistema regulador de dos componentes (HprSR) involucrado en la respuesta a un ambiente con H₂O₂ (peróxido de hidrógeno), actuando como regulador de respuesta ante el reconocimiento de H₂O₂ por el sensor de quinasa (Urano y colaboradores 2017). El gen *hlyE* codifica para una hemoliosina relacionada con una mejora en la colonización de órganos de ratones (Fuentes y colaboradores 2008). El gen de modulación dependiente de la biopelícula (*bdm*) desempeña un papel en la formación de biopelícula inducida por estrés osmótico en *Escherichia coli*, y su delección puede dar como resultado una regulación negativa de los genes de biosíntesis de flagelos, dando como consecuencia un defecto de motilidad para esta bacteria (Kim y colaboradores 2015).

Para S-347, de los 641 genes asignados como únicos, 490 son proteínas hipotéticas y 151 genes conocidos, tales como *virB*, *vapBC*, *ccdAB*, *potE*, *higB2*, *umuDC*, *parA*, *traN*, *rrrD*, *lexA*, *cdtAB* descritos a continuación por su relevancia con el presente estudio.

El gen *virB* es un activador de la transcripción de las invasinas IpaB, IpaC e IpaD de *Shigella*, que en *Salmonella*, sus homólogos son las proteínas SipB y SipC (*Salmonella* invasion protein C), necesarias para la internalización bacteriana en las células epiteliales (Kaniga y colaboradores 1995). *PotE* es un transportador que contribuye al crecimiento celular generando un potencial de membrana y aumentando el pH en el medio externo, cuando la bacteria se encuentra en condiciones ácidas, ya que produce putrecina utilizando ornitina y lo excreta, de ahí el nombre de PotE a esta proteína (putrescine-ornithine antiporter) (Tomitori y colaboradores 2012). La proteína LexA es un represor de la expresión del operón *umuCD*, el cual se activa al degradarse LexA por daño al ADN, por lo que UmuD y UmuC aumentan para llevar a cabo la reparación del ADN (Ollivierre y colaboradores 2010).

Algunos sistemas toxina-antitoxina (TA) que se encuentran en *Salmonella* tienen como finalidad el mantenimiento y estabilidad de plásmidos, como los sistemas *ccdAB* y *vapBC2*, de los cuales se encontraron en S-347 los genes *ccdAB*, *vapVC*, y un gen (*parA*) codificante de un sistema de partición, además de éstas tareas, se ha demostrado que el módulo *ccdAB* contribuye a la estabilidad del plásmido pSLT y *vapBC2* a la virulencia bacteriana (Lobato-Marquez y colaboradores 2016). Se ha propuesto también que VapC es una clase de RNasa beneficiosa durante las tensiones

ambientales, por inhibir la traducción reduciendo la tasa de error de una mala traducción, así como reduciendo el consumo de nutrientes en caso de escasez en el entorno, y su antitoxina VapB para reactivar este proceso (Winther y Gerdes, 2011). Otro componente TA localizado en S-347 aunque fue HigB2, que es parte del sistema HigB2/HigA2 que inhibe la traducción de ARNm y estabiliza plásmidos eficientemente en *E. coli* (Christensen-Dalsgaard y Gerdes, 2006).

El gen *traN* se considera esencial para la transferencia conjugativa del plásmido F, ya que cuando el pilus F se ensambla en la membrana externa de la célula donante, la proteína codificada por este gen que está ensamblada en la punta del pilus, interactúa y se une a la célula receptora, permitiendo que el apareamiento se establezca y proceda la transferencia del plásmido conjugativo del donante a la célula receptora (Chan y colaboradores 2006).

RrrD es una endolisina que su sobre expresión puede conducir a una lisis celular (Srividhya y Krishnaswamy, 2007). También se menciona que las cepas mutantes (sin gen) de *rrrD* hace que se altere la formación de biopelícula basada en la proteína Curli (Toba y colaboradores 2011).

Los genes *cdtA* y *cdtB* presentes en S-347, son parte de una toxina tipo AB₂ llamada toxina de distensión citoletal o Cdt por sus siglas en inglés, que está compuesta por una subunidad activa A (CdtB) y dos subunidades B (CdtA y CdtC), sin embargo, en serotipos selectos de *Salmonella* la Cdt se representa con una configuración A₂B₅ con dos subunidades activas (CdtB y PltA) y cinco subunidades de unión (PltB) que provocan una detención del ciclo celular, consecuencia del daño al ADN de células eucariotas infectadas con cepas positivas a esta toxina, como los serotipos analizados en la investigación de Miller y Wiedmann (2016), tomando en cuenta 21 serotipos de NTS causantes de la mayoría de casos clínicos de salmonelosis en humanos en Estados Unidos durante el año 2011, entre ellos el serotipo Oranienburg que tuvo una presencia positiva de estos genes en el 100 % de los aislados utilizados.

7. CONCLUSIONES

En la presente investigación se obtuvo un perfil de resistencia a antimicrobianos de *S. Oranienburg* de origen clínico (S-347) y ambiental (S-76) con resultados susceptibles a los 22 antibióticos para ambas bacterias. Además, se secuenció el genoma de S-347 y de anotaron el de ambas bacterias, identificando genes codificantes para bombas de eflujo y una mutación en *parC* relacionada a la resistencia a dos antimicrobianos no utilizados en este trabajo.

Como parte de las anotaciones de los productos de secuenciación, se identificaron mayor número de secuencias codificantes y una mayor longitud (9 %) en el genoma de S-347 en comparación con S-76. Otra diferencia entre estas dos cepas de *Salmonella* fue la presencia de genes en S-347 involucrados en el mantenimiento y estabilidad de plásmidos, así como de genes esenciales en la transferencia de estos mismos. Con relación a plásmidos, se encontró un replicón homólogo de plásmido reconocido en una cepa de *S. Paratyphi C* en el genoma de S-347 únicamente.

La búsqueda de la presencia de islas de patogenicidad de *Salmonella* en ambas cepas en estudio arrojó como resultado que ambos genomas contaban con las mismas islas, excepto por la ausencia de las islas 7, 8 y 10 en ambas bacterias y la identificación de las islas 4 y 12 en S-76, estas últimas con funciones como la de mediar el contacto y la invasión en células intestinales, y la supervivencia en macrófagos respectivamente.

8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda profundizar en la búsqueda e identificación del posible plásmido de la cepa S-347 y de diferentes aislados de origen clínico y ambiental de la región de Sinaloa, además de la determinación del perfil de resistencia antimicrobiano de cepas cada vez más recientes y con un mayor número de estas. Esto encaminado con el objetivo de conocer si estas cepas de *Salmonella* pueden representar un peligro potencial al presentar algún tipo de resistencia a antibióticos en caso de llegar a la población.

9. REFERENCIAS

- Acar, J. F., Courvalin, P., y Chabbert, Y. A. (1970). Methicillin-resistant staphylococemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 10, 280-285.
- Aldous, W. K., Pounder, J. I., Cloud, J. L., y Woods, G. L. (2005). Comparison of six methods of extracting Mycobacterium tuberculosis DNA from processed sputum for testing by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 43(5), 2471-2473. doi:10.1128/JCM.43.5.2471-2473.2005
- Alikhan, N. F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., y Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics*, 12(1), 402. doi:10.1186/1471-2164-12-402
- Andino, A., y Hanning, I. (2015). Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *ScientificWorldJournal*, 2015, 520179. doi:10.1155/2015/520179
- Anriany, Y. A., Weiner, R. M., Johnson, J. A., De Rezende, C. E., y Joseph, S. W. (2001). Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 displays a rugose phenotype. *Appl Environ Microbiol*, 67(9), 4048-4056. doi:10.1128/aem.67.9.4048-4056.2001
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W., y Collinson, S. K. (1998). Thin aggregative fimbriae enhance Salmonella enteritidis biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, 162(2), 295-301. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13012.x
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., . . . Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
- Baker, S., y Dougan, G. (2007). The Genome of Salmonella enterica Serovar Typhi. *Clin Infect Dis*, 45, S29-S33. doi:10.1086/518143
- Barak, J. D., Jahn, C. E., Gibson, D. L., y Charkowski, A. O. (2007). The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by Salmonella enterica. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(9), 1083-1091. doi:10.1094/MPMI-20-9-1083
- Barnhart, M. M., y Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*, 60, 131-147. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142106
- Baudart, J., Lemarchand, K., Brisabois, A., y Lebaron, P. (2000). Diversity of Salmonella Strains Isolated from the Aquatic Environment as Determined by Serotyping and Amplification of the Ribosomal DNA Spacer Regions. *App. Environ. Microbiol*, 66(4), 1544-1552. doi:10.1128/AEM.66.4.1544-1552.2000
- Boddicker, J. D., Ledebor, N. A., Jagnow, J., Jones, B. D., y Clegg, S. (2002). Differential binding to and biofilm formation on, HEp-2 cells by Salmonella enterica serovar Typhimurium is dependent upon allelic variation in the fimH gene of the fim gene cluster. *Mol Microbiol*, 45(5), 1255-1265. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03121.x

- Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., . . . Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. doi:10.1093/jac/dkaa345
- Brands, D. A., Inman, A. E., Gerba, C. P., Mare, C. J., Billington, S. J., Saif, L. A., . . . Joens, L. A. (2005). Prevalence of Salmonella spp. in oysters in the United States. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), 893-897. doi:10.1128/AEM.71.2.893-897.2005
- Brenner, D. (1984). Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In J. C. N.R. Krieg & J.C. Holt (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 1, pp. 408-516). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Brenner, F. W., Slutsker, L., Tauxe, R. V., Roels, T. H., Olsen, S. J., Bean, N., y Bishop, R. (2001). The Changing Epidemiology of Salmonella: Trends in Serotypes Isolated from Humans in the United States, 1987–1997. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(5), 753-761. doi:10.1086/318832
- Brussow, H., Canchaya, C., y Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(3), 560-602, table of contents. doi:10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
- Cain, A. K., y Hall, R. M. (2012a). Evolution of a multiple antibiotic resistance region in IncHI1 plasmids: reshaping resistance regions in situ. *J Antimicrob Chemother*, 67(12), 2848-2853. doi:10.1093/jac/dks317
- Cain, A. K., y Hall, R. M. (2012b). Evolution of IncHI2 plasmids via acquisition of transposons carrying antibiotic resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*, 67(5), 1121-1127. doi:10.1093/jac/dks004
- Carattoli, A., Villa, L., Fortini, D., y Garcia-Fernandez, A. (2018). Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae. *Plasmid*, 102392. doi:10.1016/j.plasmid.2018.12.001
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., . . . Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(7), 3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14
- Cardona-Castro, N., y Sánchez-Jiménez, M. (2003). Mecanismos de interacción Salmonella con la mucosa intestinal. *Asociación Colombiana de Infectología*, 7(1), 22-29.
- Castañeda-Ruelas, G. M., y Jiménez, M. (2018). EVALUACIÓN DE RÍOS DEL VALLE DE CULIACÁN, MÉXICO, COMO RESERVORIOS DE SEROTIPOS DE *Salmonella* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. *Rev Int Contam Ambie*, 34(2), 191-201. doi:10.20937/RICA.2018.34.02.01
- Catalao, L. P., Joao, M., Ferreiro, V. S., Fidalgo, M. L., Garcia, M. E., y Borrego, J. J. (2000). Occurrence of Salmonella spp in estuarine and coastal waters of Portugal. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(1), 99-106. doi:10.1023/a:1002733516539
- CDC. (1999). Outbreak of Salmonella serotype Muenchen infections associated with unpasteurized

orange juice--United States and Canada, June 1999. *48*(27), 582.

- CDC. (2002). Outbreak of Salmonella serotype Kottbus infections associated with eating alfalfa sprouts--Arizona, California, Colorado, and New Mexico, February-April 2001. . *51*(1), 7.
- CDC. (2016). Multistate Outbreak of Salmonella Oranienburg Infections Linked to Good Earth Egg Company Shell Eggs (Final Update)
- CENETEC. (2018). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de diarrea aguda en pacientes de 2 meses a 5 años de edad, el en primer y segundo nivel de atención. Guía de evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica*. Retrieved from <https://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/GPC-SS-156-18/ER.pdf>
- CENETEC. (2020). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de diarrea aguda en el paciente adulto en primer nivel de atención. Guía de evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica*. Retrieved from <https://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/GPC-SS-106-20/ER.pdf>
- Chambers, D., y Hulse, A. (2006). *Salmonella* Serovars in the Herpetofauna of Indiana County, Pennsylvania. *App. Environ. Microbiol*, *72*(5), 3771-3773. doi:10.1128/AEM.72.5.3771-3773.2006
- Chan, C., Chiu, T., y Kang, R. (2006). Construction of a Plasmid that Increases the Level of ompA Gene Expression in *Escherichia coli* for the Study of its Effect on Bacterial Conjugation. *JEMI*, *9*, 102-107.
- Chausse, A. M., Grepinet, O., Bottreau, E., Le Vern, Y., Menanteau, P., Trotureau, J., . . . Velge, P. (2011). Expression of Toll-like receptor 4 and downstream effectors in selected cecal cell subpopulations of chicks resistant or susceptible to *Salmonella* carrier state. *Infection and immunity*, *79*(8), 3445-3454. doi:10.1128/IAI.00025-11
- Chen, J., Karanth, S., y Pradhan, A. K. (2020). Quantitative microbial risk assessment for *Salmonella*: Inclusion of whole genome sequencing and genomic epidemiological studies, and advances in the bioinformatics pipeline. *Journal of Agriculture and Food Research*, *2*, 100045. doi:10.1016/j.jafr.2020.100045
- Chen, K., Dong, N., Zhao, S., Liu, L., Li, R., Xie, M., . . . Chen, S. (2018). Identification and Characterization of Conjugative Plasmids That Encode Ciprofloxacin Resistance in *Salmonella*. *Antimicrob Agents Chemother*, *62*(8). doi:10.1128/AAC.00575-18
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., y Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic Acids Res*, *44*(D1), D694-697. doi:10.1093/nar/gkv1239
- Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., . . . Meng, J. (2004). Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol*, *70*(1), 1-7. doi:10.1128/aem.70.1.1-7.2004
- Choi, J., Shin, D., Kim, M., Park, J., Lim, S., y Ryu, S. (2012). LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes. *PLOS ONE*, *7*(5), e37059. doi:10.1371/journal.pone.0037059
- Christensen-Dalsgaard, M., y Gerdes, K. (2006). Two *higBA* loci in the *Vibrio cholerae* superintegron encode mRNA cleaving enzymes and can stabilize plasmids. *Mol Microbiol*,

62(2), 397-411. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05385.x

- CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. In *CLSI supplement M100*. Wayne, PA.
- Coburn, B., Grassl, G. A., y Finlay, B. B. (2007). Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, 85(2), 112-118. doi:10.1038/sj.icb.7100007
- Coil, D., Jospin, G., y Darling, A. E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4), 587-589. doi:10.1093/bioinformatics/btu661
- Collinson, S. K., Clouthier, S. C., Doran, J. L., Banser, P. A., y Kay, W. W. (1996). Salmonella enteritidis agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J Bacteriol*, 178(3), 662-667. doi:10.1128/jb.178.3.662-667.1996
- Contreras-Soto, M., Medrano-Félix, J., Sañudo-Barajas, J., Vélez-de la Rocha, R., Ibarra-Rodríguez, J., Martínez-Urtaza, J., . . . Castro-del Campo, N. (2021). Structural variations on Salmonella biofilm by exposition to river water. *Int J Environ Health Res*, 1-18. doi:10.1080/09603123.2021.1901863
- Contreras-Soto, M. B., Medrano-Félix, J. A., Ibarra-Rodríguez, J. R., Martínez-Urtaza, J., Chaidez-Quiroz, C., y Castro-del Campo, N. (2019). The last 50 years of Salmonella in Mexico: Sources of isolation and factors that influence its prevalence and diversity. *Revista Bio Ciencias*, 6(2), e540. doi:<http://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.02.02>
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., y Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*, 52(3), 375-395.
- Crawford, R. W., Gibson, D. L., Kay, W. W., y Gunn, J. S. (2008). Identification of a bile-induced exopolysaccharide required for Salmonella biofilm formation on gallstone surfaces. *Infection and immunity*, 76(11), 5341-5349. doi:10.1128/IAI.00786-08
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramirez-Aguilar Mde, L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C., y Gunn, J. S. (2010). Gallstones play a significant role in Salmonella spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4353-4358. doi:10.1073/pnas.1000862107
- Cui, L., Wang, X., Huang, D., Zhao, Y., Feng, J., Lu, Q., . . . Dai, M. (2020). CRISPR-cas3 of Salmonella Upregulates Bacterial Biofilm Formation and Virulence to Host Cells by Targeting Quorum-Sensing Systems. *Pathogens*, 9(1), 53. doi:10.3390/pathogens9010053
- de Toro, M., Lanza, V. F., Vielva, L., Redondo-Salvo, S., y de la Cruz, F. (2020). Plasmid Reconstruction from Next-Gen Data: A Detailed Protocol for the Use of PLACNETw for the Reconstruction of Plasmids from WGS Datasets. *Methods Mol Biol*, 2075, 323-339. doi:10.1007/978-1-4939-9877-7_23
- Desvillechabrol, D., Bouchier, C., Kennedy, S., y Cokelaer, T. (2018). Sequana coverage: detection and characterization of genomic variations using running median and mixture models. *GigaScience*, 7(12), giy110. doi:10.1093/gigascience/giy110
- DGE, D. G. d. E. (2019). *Casos por entidad federativa de enfermedades infecciosas y parasitarias del aparato digestivo hasta la semana epidemiológica 52 (Cuadro 4.1). Vigilancia epidemiológica semana 52, 2019.* Retrieved from

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/522437/BSEMANAL_52.pdf

- Diepold, A., y Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1679), 20150020. doi:10.1098/rstb.2015.0020
- Dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., y Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence Factors in Salmonella Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Curr Microbiol*, 76(6), 762-773. doi:10.1007/s00284-018-1510-4
- Doster, E., Lakin, S. M., Dean, C. J., Wolfe, C., Young, J. G., Boucher, C., . . . Morley, P. S. (2020). MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Res*, 48(D1), D561-D569. doi:10.1093/nar/gkz1010
- Eaves, D. J., Randall, L., Gray, D. T., Buckley, A., Woodward, M. J., White, A. P., y Piddock, L. J. (2004). Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of gyrA, gyrB, parC, and parE and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant Salmonella enterica. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 4012-4015. doi:10.1128/AAC.48.10.4012-4015.2004
- Ehrbar, K., y Hardt, W. D. (2005). Bacteriophage-encoded type III effectors in Salmonella enterica subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol*, 5(1), 1-9. doi:10.1016/j.meegid.2004.07.004
- Ellermeier, C., y Schlauch, J. (2006). The Prokaryotes. In *The genus Salmonella* (Vol. 6, pp. 123-158).
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., y Lee, L.-H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284-293. doi:10.1080/21553769.2015.1051243
- Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., y Hall, L. M. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, 357(9265), 1325-1328. doi:10.1016/S0140-6736(00)04519-0
- Estrada-Acosta, M., Jiménez, M., Chaidez, C., León, J., y Castro-del Campo, N. (2014). Irrigation water quality and the benefits of implementing good agricultural practices during tomato (*Lycopersicon esculentum*) production. *Environ Monit Assess*, 186(7), 4323-4330. doi:10.1007/s10661-014-3701-1
- Estrada-Acosta, M. D., Ramirez, K., Medrano-Felix, J. A., Castro-Del Campo, N., Lopez-Moreno, H. S., Jimenez Edeza, M., . . . Chaidez, C. (2018). Effect of river water exposition on adhesion and invasion abilities of Salmonella Oranienburg and Saintpaul. *Int J Environ Health Res*, 28(1), 43-54. doi:10.1080/09603123.2017.1415308
- Fábrega, A., y Vila, J. (2013). Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev*, 26(2), 308-341. doi:10.1128/CMR.00066-12
- Fierer, J., y Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 775-780. doi:10.1172/JCI12561

- Figueroa-Bossi, N., y Bossi, L. (1999). Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. *Mol Microbiol*, 33(1), 167-176. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01461.x
- Foley, S. L., Johnson, T. J., Ricke, S. C., Nayak, R., y Danzeisen, J. (2013). Salmonella pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(4), 582-607. doi:10.1128/MMBR.00015-13
- Folster, J. P., Pecic, G., McCullough, A., Rickert, R., y Whichard, J. M. (2011). Characterization of bla(CMY)-encoding plasmids among Salmonella isolated in the United States in 2007. *Foodborne Pathog Dis*, 8(12), 1289-1294. doi:10.1089/fpd.2011.0944
- Folster, J. P., Pecic, G., Rickert, R., Taylor, J., Zhao, S., Fedorka-Cray, P. J., . . . McDermott, P. (2012). Characterization of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar heidelberg from a ground turkey-associated outbreak in the United States in 2011. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(6), 3465-3466. doi:10.1128/AAC.00201-12
- Frawley, E. R., Crouch, M. L., Bingham-Ramos, L. K., Robbins, H. F., Wang, W., Wright, G. D., y Fang, F. C. (2013). Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in Salmonella Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(29), 12054-12059. doi:10.1073/pnas.1218274110
- Frenk, J., Enriquez, E., Burgoa, C., Cedillo, L., Torres, V., y Barraza, A. (2002). *Primer diagnostico nacional de salud ambiental y ocupacional*. Retrieved from www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7658.pdf
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., y Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature reviews. Microbiology*, 3(9), 722-732. doi:10.1038/nrmicro1235
- Fuentes, J. A., Villagra, N., Castillo-Ruiz, M., y Mora, G. C. (2008). The Salmonella Typhi hlyE gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to S. Typhimurium promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol*, 159(4), 279-287. doi:10.1016/j.resmic.2008.02.006
- Gal-Mor, O., y Finlay, B. B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol*, 8(11), 1707-1719. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00794.x
- Galan, J. E. (2001). Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17(1), 53-86. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.53
- Garcia, P., Hopkins, K. L., Garcia, V., Beutlich, J., Mendoza, M. C., Threlfall, J., . . . Med-Vet-Net, W. P. P. G. (2014). Diversity of plasmids encoding virulence and resistance functions in Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium monophasic variant 4,[5],12:i:- strains circulating in Europe. *PLOS ONE*, 9(2), e89635. doi:10.1371/journal.pone.0089635
- Garza-Gonzalez, E., Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Trevino, S., Rodríguez-Noriega, E., . . . Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, 14(3), e0209865. doi:10.1371/journal.pone.0209865
- Geddes, A. M., y Goodall, J. A. (1972). Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *Br Med J*, 3(5825), 525. doi:10.1136/bmj.3.5825.525
- Gerlach, R. G., Claudio, N., Rohde, M., Jackel, D., Wagner, C., y Hensel, M. (2008). Cooperation

- of Salmonella pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol*, 10(11), 2364-2376. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01218.x
- Gerlach, R. G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W. D., y Hensel, M. (2007). Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol*, 9(7), 1834-1850. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00919.x
- Gilmour, M. W., Thomson, N. R., Sanders, M., Parkhill, J., y Taylor, D. E. (2004). The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*, 52(3), 182-202. doi:10.1016/j.plasmid.2004.06.006
- Gomez, T. M., Motarjemi, Y., Miyagawa, S., Kaferstein, F. K., y Stohr, K. (1997). Foodborne salmonellosis. *World Health Stat Q*, 50(1-2), 81-89.
- Gonzalez-Escobedo, G., Marshall, J. M., y Gunn, J. S. (2011). Chronic and acute infection of the gall bladder by Salmonella Typhi: understanding the carrier state. *Nature reviews. Microbiology*, 9(1), 9-14. doi:10.1038/nrmicro2490
- Graziani, C., Losasso, C., Luzzi, I., Ricci, A., Scavia, G., y Pasquali, P. (2017). Salmonella. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, y H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases (Third Edition)* (pp. 133-169): Academic Press.
- Guiney, D. G., y Fierer, J. (2011). The Role of the spv Genes in Salmonella Pathogenesis. *Front Microbiol*, 2, 129. doi:10.3389/fmicb.2011.00129
- Hacker, J., y Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 54(1), 641-679. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.641
- Haley, B. J., Cole, D. J., y Lipp, E. K. (2009). Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne Salmonellae in a Rural Watershed. *Appl Environ Microbiol*, 75(5), 1248-1255. doi:10.1128/AEM.01648-08
- Hallstrom, K. N., y McCormick, B. A. (2015). Pathogenicity Islands. In Y.-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, y J. Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 303-314). Boston: Academic Press.
- Hamilton, S., Bongaerts, R. J., Mulholland, F., Cochrane, B., Porter, J., Lucchini, S., . . . Hinton, J. C. (2009). The transcriptional programme of Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. *BMC genomics*, 10, 599. doi:10.1186/1471-2164-10-599
- Han, J., Lynne, A. M., David, D. E., Tang, H., Xu, J., Nayak, R., . . . Foley, S. L. (2012). DNA sequence analysis of plasmids from multidrug resistant Salmonella enterica serotype Heidelberg isolates. *PLOS ONE*, 7(12), e51160. doi:10.1371/journal.pone.0051160
- Haneda, T., Ishii, Y., Danbara, H., y Okada, N. (2009). Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to Salmonella virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett*, 297(2), 241-249. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01686.x
- Haraga, A., Ohlson, M. B., y Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature reviews. Microbiology*, 6(1), 53-66. doi:10.1038/nrmicro1788
- Harmer, C. J., y Hall, R. M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid*, 80, 63-82. doi:10.1016/j.plasmid.2015.04.003

- Hedberg, C. W., Korlath, J. A., D'Aoust, J. Y., White, K. E., Schell, W. L., Miller, M. R., . . . Osterholm, M. T. (1992). A multistate outbreak of *Salmonella javiana* and *Salmonella oranienburg* infections due to consumption of contaminated cheese. *Jama*, *268*(22), 3203-3207.
- Hendriksen, R. S., Seyfarth, A. M., Jensen, A. B., Whichard, J., Karlsmose, S., Joyce, K., . . . Aarestrup, F. M. (2009). Results of use of WHO Global Salm-Surv external quality assurance system for antimicrobial susceptibility testing of *Salmonella* isolates from 2000 to 2007. *J Clin Microbiol*, *47*(1), 79-85. doi:10.1128/JCM.00894-08
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D. M., Jensen, A. B., Wegener, H. C., y Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*, *8*(8), 887-900. doi:10.1089/fpd.2010.0787
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., . . . Meresse, S. (2006). The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(36), 13497-13502. doi:10.1073/pnas.0605443103
- Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F., y Moore, A. (2005). Analyses of Livestock Production, Waste Storage, and Pathogen Levels and Prevalences in Farm Manures. *Appl Environ Microbiol*, *71*(3), 1231-1236. doi:10.1128/AEM.71.3.1231-1236.2005
- Ilyas, B., Tsai, C. N., y Coombes, B. K. (2017). Evolution of *Salmonella*-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*(428), 428. doi:10.3389/fcimb.2017.00428
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., y Ochman, H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol*, *192*(2), 560-567. doi:10.1128/JB.01233-09
- JECFA, J. F. W. E. C. o. F. A. (2000). Evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO. *Technical Report Series.*, *893*(1), 21-54.
- Jennings, E., Thurston, T. L. M., y Holden, D. W. (2017). *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. *Cell Host Microbe*, *22*(2), 217-231. doi:10.1016/j.chom.2017.07.009
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., . . . McArthur, A. G. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*, *45*(D1), D566-D573. doi:10.1093/nar/gkw1004
- Jimenez, M., Martinez-Urtaza, J., y Chaidez, C. (2011). Geographical and Temporal Dissemination of *Salmonellae* Isolated from Domestic Animal Hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microb Ecol*, *61*(4), 811-820. doi:10.1007/s00248-010-9792-5
- Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J., Rodríguez-Alvarez, M. X., Leon-Felix, J., y Chaidez, C. (2014). Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in Mexico. *J Water Health*, *12*(4), 874-884. doi:10.2166/wh.2014.051
- Johnson, L., Horsman, S. R., Charron-Mazenod, L., Turnbull, A. L., Mulcahy, H., Surette, M. G.,

- y Lewenza, S. (2013). Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol*, *13*, 115. doi:10.1186/1471-2180-13-115
- Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L. M., y Melefors, O. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol*, *7*(1), 70. doi:10.1186/1471-2180-7-70
- Jones, R. M., Wu, H., Wentworth, C., Luo, L., Collier-Hyams, L., y Neish, A. S. (2008). *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe*, *3*(4), 233-244. doi:10.1016/j.chom.2008.02.016
- Jurado, R., Arenas, C., Doblaz, A., Rivero, A., y Torre-Cisneros, J. (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine*, *10*(52), 3497-3501.
- Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., y Galan, J. E. (1995). Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J Bacteriol*, *177*(14), 3965-3971. doi:10.1128/jb.177.14.3965-3971.1995
- Kim, J. S., Kim, Y. J., Seo, S., Seong, M. J., y Lee, K. (2015). Functional role of bdm during flagella biogenesis in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*, *70*(3), 369-373. doi:10.1007/s00284-014-0729-y
- Kinde, H., Adelson, M., Ardans, A., Little, E. H., Willoughby, D., Berchtold, D., . . . Hughes, E. (1997). Prevalence of *Salmonella* in Municipal Sewage Treatment Plant Effluents in Southern California. *Avian Diseases*, *41*(2), 392-398. doi:10.2307/1592195
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Keestra, A. M., Adams, L. G., y Baumler, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol*, *43*(4), 895-905. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02805.x
- Kiss, T., Morgan, E., y Nagy, G. (2007). Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett*, *275*(1), 153-159. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00871.x
- Lamas, A., Fernandez-No, I. C., Miranda, J. M., Vazquez, B., Cepeda, A., y Franco, C. M. (2016). Biofilm Formation and Morphotypes of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* Differs from Those of Other *Salmonella enterica* Subspecies in Isolates from Poultry Houses. *J Food Prot*, *79*(7), 1127-1134. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-568
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R., y Lasa, I. (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol*, *58*(5), 1322-1339. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J. R., y Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, *329*(11), 849-857. doi:10.1016/j.crvi.2006.07.008
- Lauderdale, T.-L., Aarestrup, F. M., Chen, P.-C., Lai, J.-F., Wang, H.-Y., Shiau, Y.-R., . . . Hung, C.-L. (2006). Multidrug resistance among different serotypes of clinical *Salmonella* isolates in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *55*(2), 149-155.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., . . . Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, *13*(12), 1057-

1098. doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9

- Lee, H. Y., Su, L. H., Tsai, M. H., Kim, S. W., Chang, H. H., Jung, S. I., . . . Chiu, C. H. (2009). High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(6), 2696-2699. doi:10.1128/AAC.01297-08
- Lemarchand, K., y Lebaron, P. (2003). Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol Lett*, *218*(1), 203-209. doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11519.x
- Leon, I. M., Lawhon, S. D., Norman, K. N., Threadgill, D. S., Ohta, N., Vinasco, J., y Scott, H. M. (2018). Serotype Diversity and Antimicrobial Resistance among *Salmonella enterica* Isolates from Patients at an Equine Referral Hospital. *Appl Environ Microbiol*, *84*(13), e02829-02817. doi:10.1128/AEM.02829-17
- Lobato-Marquez, D., Molina-Garcia, L., Moreno-Cordoba, I., Garcia-Del Portillo, F., y Diaz-Orejas, R. (2016). Stabilization of the Virulence Plasmid pSLT of *Salmonella* Typhimurium by Three Maintenance Systems and Its Evaluation by Using a New Stability Test. *Frontiers in molecular biosciences*, *3*, 66. doi:10.3389/fmolb.2016.00066
- López-Cuevas, O., León-Félix, J., Jiménez-Edeza, M., y Chaidez-Quiroz, C. (2009). Detección y reistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnica Mexicana*, *32*, 119-126.
- Lopez, C. A., Winter, S. E., Rivera-Chávez, F., Xavier, M. N., Poon, V., Nuccio, S. P., . . . Baumler, A. J. (2012). Phage-mediated acquisition of a type III secreted effector protein boosts growth of salmonella by nitrate respiration. *mBio*, *3*(3). doi:10.1128/mBio.00143-12
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., y Wang, Y. (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*, 270. doi:10.3389/fcimb.2019.00270
- Lu, J., Zhang, J., Xu, L., Liu, Y., Li, P., Zhu, T., . . . Bao, Q. (2018). Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrob Resist Infect Control*, *7*(1), 127. doi:10.1186/s13756-018-0415-0
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clark, D. (2009). *Biología de los microorganismos* (12 ed.).
- Magnet, S., Courvalin, P., y Lambert, T. (1999). Activation of the cryptic aac(6')-Iy aminoglycoside resistance gene of *Salmonella* by a chromosomal deletion generating a transcriptional fusion. *J Bacteriol*, *181*(21), 6650-6655. doi:10.1128/JB.181.21.6650-6655.1999
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., . . . Hoekstra, R. M. (2010). International collaboration on enteric disease “Burden of Illness” studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, *50*, 882-889.
- Malcova, M., Hradecka, H., Karpiskova, R., y Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Vet Microbiol*, *129*(3-4), 360-366. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.006

- Manon, R., Nadia, A., Fatemeh, N., Isabelle, V.-P., Philippe, V., y Agnes, W. (2012). The Different Strategies Used by Salmonella to Invade Host Cells. In *Salmonella - Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*.
- Marder, M. E. P., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Hurd, S., Jervis, R., . . . Geissler, A. L. (2018). Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 67(11), 324-328. doi:10.15585/mmwr.mm6711a3
- Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodriguez-Bano, J., Bou, G., . . . Grupo de Estudio de Infeccion, H. (2006). [Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in Acinetobacter baumannii clinical isolates]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24(2), 77-80. doi:10.1157/13085012
- Martínez-Urtaza, J., Liebana, E., Garcia-Migura, L., Perez-Pineiro, P., y Saco, M. (2004). Characterization of Salmonella enterica serovar typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Appl Environ Microbiol*, 70(7), 4030-4034. doi:10.1128/AEM.70.7.4030-4034.2004
- Martinez-Urtaza, J., Saco, M., de Novoa, J., Perez-Pineiro, P., Peiteado, J., Lozano-Leon, A., y Garcia-Martin, O. (2004). Influence of environmental factors and human activity on the presence of Salmonella serovars in a marine environment. *Appl Environ Microbiol*, 70(4), 2089-2097. doi:10.1128/aem.70.4.2089-2097.2004
- Mazel, D., y Davies, J. (1999). Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol Life Sci*, 56(9-10), 742-754. doi:10.1007/s000180050021
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P., y Holden, D. W. (2008). SpvC is a Salmonella effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol*, 67(6), 1371-1383. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06134.x
- McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D., y Koronakis, V. (2009). Salmonella takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol*, 12(1), 117-124. doi:10.1016/j.mib.2008.12.001
- McLaughlin, L. M., Govoni, G. R., Gerke, C., Gopinath, S., Peng, K., Laidlaw, G., . . . Monack, D. (2009). The Salmonella SPI2 effector SseI mediates long-term systemic infection by modulating host cell migration. *PLoS Pathog*, 5(11), e1000671. doi:10.1371/journal.ppat.1000671
- McMillan, E. A., Gupta, S. K., Williams, L. E., Jove, T., Hiott, L. M., Woodley, T. A., . . . Frye, J. G. (2019). Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in Salmonella enterica Associated With United States Food Animals. *Front Microbiol*, 10, 832. doi:10.3389/fmicb.2019.00832
- McMillan, E. A., Jackson, C. R., y Frye, J. G. (2020). Transferable Plasmids of Salmonella enterica Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol*, 11(2497), 562181. doi:10.3389/fmicb.2020.562181
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., y Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Curr Opin Genet Dev*, 15(6), 589-594.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>

- Medrano-Felix, A., Estrada-Acosta, M., Jimenez, M., Gomez-Gil, B., Leon-Felix, J., Amarillas, L., y Chaidez, C. (2013). Draft Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype Oranienburg Strain S-76, Isolated from an Aquatic Environment. *Genome announcements*, *1*(6), e01017-01013. doi:10.1128/genomeA.01017-13
- Medrano-Felix, A., Estrada-Acosta, M., Peraza-Garay, F., Castro-Del Campo, N., Martinez-Urtaza, J., y Chaidez, C. (2017). Differences in carbon source utilization of *Salmonella* Oranienburg and Saintpaul isolated from river water. *Int J Environ Health Res*, *27*(4), 252-263. doi:10.1080/09603123.2017.1332349
- Medrano-Félix, J. A., Chaidez, C., Mena, K. D., Soto-Galindo, M. D. S., y Castro-Del Campo, N. (2018). Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* at the air-liquid interface in aquatic environments. *Environ Monit Assess*, *190*(4), 221. doi:10.1007/s10661-018-6585-7
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsohis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Baumler, A. J., y Miller, S. I. (1999). *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol*, *34*(4), 850-864. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01651.x
- Miller, R. A., y Wiedmann, M. (2016). The Cytolethal Distending Toxin Produced by Nontyphoidal *Salmonella* Serotypes Javiana, Montevideo, Oranienburg, and Mississippi Induces DNA Damage in a Manner Similar to That of Serotype Typhi. *mBio*, *7*(6), e02109-02116. doi:10.1128/mBio.02109-16
- Mouton, J. W. (2018). Soup with or without meatballs: Impact of nutritional factors on the MIC, kill-rates and growth-rates. *Eur J Pharm Sci*, *125*, 23-27. doi:10.1016/j.ejps.2018.09.008
- Nair, S., Lin, T. K., Pang, T., y Altwegg, M. (2002). Characterization of *Salmonella* serovars by PCR-Single-Strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, *40*(7), 2346-2351.
- NCBI. (2019). *Salmonella enterica*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=salmonella+enterica>
- Nikaido, E., Yamaguchi, A., y Nishino, K. (2008). AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem*, *283*(35), 24245-24253. doi:10.1074/jbc.M804544200
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss, R., 3rd, Datta, N., y Falkow, S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev*, *40*(1), 168-189.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., y Groisman, E. A. (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(15), 7800-7804. doi:10.1073/pnas.93.15.7800
- Ollivierre, J. N., Fang, J., y Beuning, P. J. (2010). The Roles of UmuD in Regulating Mutagenesis. *Journal of nucleic acids*, *2010*, 947680. doi:10.4061/2010/947680
- OMS. (2018). *Salmonella (no tifoidea)*. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., . . . Stevens, R. (2014).

The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D206-214. doi:10.1093/nar/gkt1226

- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., . . . Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421
- Pande, V. V., McWhorter, A. R., y Chousalkar, K. K. (2016). Salmonella enterica isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. *Biofouling*, 32(7), 699-710. doi:10.1080/08927014.2016.1191068
- Pando, J. M., Karlinsey, J. E., Lara, J. C., Libby, S. J., y Fang, F. C. (2017). The Rcs-Regulated Colanic Acid Capsule Maintains Membrane Potential in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *mBio*, 8(3), e00808-00817. doi:10.1128/mBio.00808-17
- Parry, C. M., y Threlfall, E. J. (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Curr Opin Infect Dis*, 21(5), 531-538. doi:10.1097/QCO.0b013e32830f453a
- Paul, S., Sokurenko, E. V., y Chattopadhyay, S. (2016). Corrected Genome Annotations Reveal Gene Loss and Antibiotic Resistance as Drivers in the Fitness Evolution of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 198(23), 3152-3161. doi:10.1128/JB.00545-16
- Pedersen, S. K., Wagenaar, J. A., Vigre, H., Roer, L., Mikoleit, M., Aidara-Kane, A., . . . Hendriksen, R. S. (2018). Proficiency of WHO Global Foodborne Infections Network External Quality Assurance System Participants in Identification and Susceptibility Testing of Thermotolerant Campylobacter spp. from 2003 to 2012. *J Clin Microbiol*, 56(11). doi:10.1128/JCM.01066-18
- Peng, D. (2016). Biofilm Formation of Salmonella, Microbial Biofilms - Importance and Applications. *IntechOpen*. doi:10.5772/62905
- Phan, M. D., Kidgell, C., Nair, S., Holt, K. E., Turner, A. K., Hinds, J., . . . Wain, J. (2009). Variation in Salmonella enterica serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2), 716-727. doi:10.1128/AAC.00645-08
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J., y Gheesling, L. L. (2003). Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology*, 154(3), 173-174. doi:[https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00025-1)
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H., y Gunn, J. S. (2002). Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by Salmonella spp. *Infection and immunity*, 70(5), 2640-2649. doi:10.1128/iai.70.5.2640-2649.2002
- Puerta-García, A., y Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431.
- Rajput, A., Thakur, A., Sharma, S., y Kumar, M. (2018). aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D894-D900. doi:10.1093/nar/gkx1157
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L., y Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 242-255. doi:10.1016/s0325-7541(14)70079-3

- Ramírez, K., Burgueño-Roman, A., Castro-del Campo, N., López-Moreno, H. S., y Chaidez, C. (2018). *In vitro* invasiveness and intracellular survival of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment. *Water and Environment Journal*, 33(4), 633-640. doi:10.1111/wej.12436
- Ray, K. A., Warnick, L. D., Mitchell, R. M., Kaneene, J. B., Ruegg, P. L., Wells, S. J., . . . May, K. (2006). Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella* from Organic and Conventional Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2038-2050. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72271-8
- Refsum, T., Handeland, K., Baggesen, D. L., Holstad, G., y Kapperud, G. (2002). *Salmonellae* in Avian Wildlife in Norway from 1969 to 2000. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5595-5599. doi:10.1128/AEM.68.11.5595-5599.2002
- Römbling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol*, 153(4), 205-212. doi:10.1016/s0923-2508(02)01316-5
- Römbling, U. (2005). Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci*, 62(11), 1234-1246. doi:10.1007/s00018-005-4557-x
- Römbling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W. D., y Normark, S. (1998). Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol*, 180(3), 722-731. doi:10.1128/JB.180.3.722-731.1998
- Römbling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., y Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol*, 28(2), 249-264. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00791.x
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P. E., y Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analysing pathogenic bacteria. *New Microbes New Infect*, 7, 72-85. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.06.005>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., . . . Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 73(5), 1121-1137. doi:10.1093/jac/dkx488
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., y Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 1-13. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x %J FEMS Microbiology Letters
- Salipante, S. J., y Hall, B. G. (2003). Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. *Molecular biology and evolution*, 20(4), 653-659. doi:10.1093/molbev/msg074
- Santos, R. L., Raffatellu, M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tukel, C., Tsois, R. M., y Baumler, A. J. (2009). Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol*, 17(11), 498-506. doi:10.1016/j.tim.2009.08.008
- Schubert, S., Rakin, A., y Heesemann, J. (2004). The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol*, 294(2), 83-94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.026>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153

- Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., y Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(6), 2593-2597. doi:10.1073/pnas.93.6.2593
- Silva, C., Puente, J. L., y Calva, E. (2017). *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathog Dis*, 75(6). doi:10.1093/femspd/ftx070
- Simental, L., y Martinez-Urtaza, J. (2008). Climate patterns governing the presence and permanence of salmonellae in coastal areas of Bahia de Todos Santos, Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 74(19), 5918-5924. doi:10.1128/AEM.01139-08
- Sirinavin, S., Thavornnunth, J., Sakchainanont, B., Bangtrakulnonth, A., Chongthawonsatid, S., y Junumporn, S. (2003). Norfloxacin and azithromycin for treatment of nontyphoidal salmonella carriers. *Clin Infect Dis*, 37(5), 685-691. doi:10.1086/377273
- Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., y Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*, 43(3), 793-808. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x
- Solomon, E. B., Niemira, B. A., Sapers, G. M., y Annous, B. A. (2005). Biofilm formation, cellulose production, and curli biosynthesis by *Salmonella* originating from produce, animal, and clinical sources. *J Food Prot*, 68(5), 906-912. doi:10.4315/0362-028x-68.5.906
- Song, S., Lee, B., Yeom, J.-H., Hwang, S., Kang, I., Cho, J.-C., . . . Kim, Y.-H. (2015). MdsABC-Mediated Pathway for Pathogenicity in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. 83(11), 4266-4276. doi:10.1128/IAI.00653-15 %J Infection and Immunity
- Spector, M., y Kenyon, W. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45, 455-481. doi:10.1016/j.foodres.2011.06.056
- Srividhya, K. V., y Krishnaswamy, S. (2007). Subclassification and targeted characterization of prophage-encoded two-component cell lysis cassette. *J Biosci*, 32(5), 979-990. doi:10.1007/s12038-007-0097-x
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., y De Keersmaecker, S. C. J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038
- Stevenson, G., Lan, R., y Reeves, P. R. (2000). The colanic acid gene cluster of *Salmonella enterica* has a complex history. *FEMS Microbiol Lett*, 191(1), 11-16. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09312.x
- Stewart, P. S., y Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135-138. doi:10.1016/s0140-6736(01)05321-1
- Su, L. H., Chiu, C. H., Chu, C., y Ou, J. T. (2004). Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin Infect Dis*, 39(4), 546-551. doi:10.1086/422726
- Sundin, G. W., y Bender, C. L. (1996). Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Mol Ecol*, 5(1), 133-143. doi:10.1111/j.1365-294x.1996.tb00299.x
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., y Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-

genome. *Curr Opin Microbiol*, 11(5), 472-477. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.006>

- Thaker, M. N., Kalan, L., Waglechner, N., Eshaghi, A., Patel, S. N., Poutanen, S., . . . Wright, G. D. (2015). Vancomycin-variable enterococci can give rise to constitutive resistance during antibiotic therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(3), 1405-1410. doi:10.1128/AAC.04490-14
- Thomason, B. M., Dodd, D. J., y Cherry, W. B. (1977). Increased recovery of salmonellae from environmental samples enriched with buffered peptone water. *App. Environ. Microbiol*, 34(3), 270-273.
- Toba, F. A., Thompson, M. G., Campbell, B. R., Junker, L. M., Rueggeberg, K. G., y Hay, A. G. (2011). Role of DLP12 lysis genes in Escherichia coli biofilm formation. *Microbiology (Reading)*, 157(Pt 6), 1640-1650. doi:10.1099/mic.0.045161-0
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., y Igarashi, K. (2012). Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in Escherichia coli. *Amino Acids*, 42(2-3), 733-740. doi:10.1007/s00726-011-0989-9
- Tomljenovic-Berube, A. M., Henriksbo, B., Porwollik, S., Cooper, C. A., Tuinema, B. R., McClelland, M., y Coombes, B. K. (2013). Mapping and Regulation of Genes within Salmonella Pathogenicity Island 12 That Contribute to In Vivo Fitness of Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Infection and immunity*, 81(7), 2394-2404. doi:10.1128/IAI.00067-13 %J Infection and Immunity
- Urano, H., Yoshida, M., Ogawa, A., Yamamoto, K., Ishihama, A., y Ogasawara, H. (2017). Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in Escherichia coli. *Microbiology (Reading)*, 163(2), 243-252. doi:10.1099/mic.0.000410
- van Asten, A. J., y van Dijk, J. E. (2005). Distribution of “classic” virulence factors among Salmonella spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44(3), 251-259. doi:10.1016/j.femsim.2005.02.002
- Vázquez-Garcidueñas, M. S., Romero-Pérez, N. L., Figueroa-Aguilar, G. A., Jaime-Sánchez, J. L., y Vázquez-Marrufo, G. (2014). Investigation of a food-borne Salmonella Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *J Infect Dev Ctries*, 8(2), 143-153. doi:10.3855/jidc.3367
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., y Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Curr Opin Microbiol*, 23, 148-154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.016>
- Villa, L., Garcia-Fernandez, A., Fortini, D., y Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*, 65(12), 2518-2529. doi:10.1093/jac/dkq347
- Wahl, A., Battesti, A., y Ansaldi, M. (2019). Prophages in Salmonella enterica: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host? *Mol Microbiol*, 111(2), 303-316. doi:10.1111/mmi.14167
- Wang, H., Huang, Y., Wu, S., Li, Y., Ye, Y., Zheng, Y., y Huang, R. (2014). Extracellular DNA inhibits Salmonella enterica Serovar Typhimurium and S. enterica Serovar Typhi biofilm development on abiotic surfaces. *Curr Microbiol*, 68(2), 262-268. doi:10.1007/s00284-013-0468-5

- Wang, S., Shi, H., Li, Y., Shi, Z., Zhang, X., Baek, C. H., . . . Curtiss, R., 3rd. (2013). A colanic acid operon deletion mutation enhances induction of early antibody responses by live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infection and immunity*, *81*(9), 3148-3162. doi:10.1128/IAI.00097-13
- Weinberger, M., y Keller, N. (2005). Recent trends in the epidemiology of non-typhoid *Salmonella* and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. *Curr Opin Infect Dis*, *18*(6), 513-521. doi:10.1097/01.qco.0000186851.33844.b2
- Werber, D., Dreesman, J., Feil, F., van Treeck, U., Fell, G., Ethelberg, S., . . . Ammon, A. (2005). International outbreak of *Salmonella* Oranienburg due to German chocolate. *BMC Infect Dis*, *5*, 7. doi:10.1186/1471-2334-5-7
- Wilharm, G., y Heider, C. (2014). Interrelationship between type three secretion system and metabolism in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*, *4*, 150. doi:10.3389/fcimb.2014.00150
- Winfield, M. D., y Groisman, E. A. (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *App. Environ. Microbiol*, *69*(7), 3687-3694. doi:10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003
- Winther, K. S., y Gerdes, K. (2011). Enteric virulence associated protein VapC inhibits translation by cleavage of initiator tRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(18), 7403-7407. doi:10.1073/pnas.1019587108
- Yoon, S. H., Park, Y. K., y Kim, J. F. (2015). PAIDB v2.0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands. *Nucleic Acids Res*, *43*(Database issue), D624-630. doi:10.1093/nar/gku985
- Yoshida, C. E., Kruczkiewicz, P., Laing, C. R., Lingohr, E. J., Gannon, V. P., Nash, J. H., y Taboada, E. N. (2016). The *Salmonella* In Silico Typing Resource (SISTR): An Open Web-Accessible Tool for Rapidly Typing and Subtyping Draft *Salmonella* Genome Assemblies. *PLOS ONE*, *11*(1), e0147101. doi:10.1371/journal.pone.0147101
- Zhang, K., Xin, R., Zhao, Z., Ma, Y., Zhang, Y., y Niu, Z. (2020). Antibiotic Resistance Genes in drinking water of China: Occurrence, distribution and influencing factors. *Ecotoxicol Environ Saf*, *188*, 109837. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109837
- Zhang, X., He, L., Zhang, C., Yu, C., Yang, Y., Jia, Y., . . . Du, F. (2019). The impact of sseK2 deletion on *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence in vivo and in vitro. *BMC Microbiol*, *19*(1), 182. doi:10.1186/s12866-019-1543-2
- Zhao, X., Yu, Z., y Ding, T. (2020). Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Microorganisms*, *8*(3), 425. doi:10.3390/microorganisms8030425
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., y Zhong, N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, *7*(58), 36670-36683. doi:10.1039/c7ra02497e
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., y Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, *39*(6), 1452-1463. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x