



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

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS DE *Salmonella*
spp. AISLADA DE HECES DE ANIMALES**

Por:

Hilary Arim Beltran Saucedo

TESIS APROBADA POR LA

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

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del C. Hilary Arim Beltrán Saucedá, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Cristóbal Chaidez Quiroz
Director de tesis



Dra. Beatriz Quiñones
Co-Directora de tesis

LÓPEZ CUEVAS OSVALDO

Dr. Osvaldo López Cuevas
Integrante del comité de tesis



Dra. Nohelia Castro del Campo
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización Genómica de Cepas de *Salmonella* spp Aisladas de Heces de Animales” 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 de la autora Hilary Arim Beltran Saucedo, 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 director(a) de tesis.



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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong", is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante dos años, para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) coordinación Culiacán, por permitirme utilizar sus instalaciones para poder llevar a cabo mis estudios durante estos años.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA) por el apoyo técnico-científico brindado para llevar a cabo el cumplimiento del proyecto de investigación.

Al Dr. Cristobal Chaidez Quiroz, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo con la realización de este proyecto de tesis bajo su dirección y asesoría. Muchas gracias por la confianza que me brindo, el apoyo constante y las palabras de aliento cuando fueron necesarias. Por ser una parte importante en mi crecimiento profesional y alentarme en todo momento a mejorar. Gracias por el conocimiento transmitido, enseñarme siempre a trabajar de la mejor manera. Gracias por ser un ejemplo importante en este camino, siempre estaré agradecida de lo que me ha enseñado.

A la Dra. Beatriz Quiñones quien formó parte importante de la dirección de este proyecto, por el apoyo brindado, los consejos y la paciencia durante la realización de este proyecto, así como también siempre proporcionarme las herramientas y medios necesarios para llevar cabo esta investigación. Gracias por su enseñanza y dedicación.

Al Dr. Osvaldo López Cuevas por sus consejos y opiniones, por compartir sus conocimientos y experiencia, gracias por siempre estar dispuesto apoyarnos y siempre tener la mejor disposición de apoyar en todos los aspectos durante este proyecto.

A la Dra. Nohelia Castro del Campo por su apoyo como parte de mi comité de tesis, sus comentarios y observaciones para la realización de este proyecto.

A la QFB Célida Isabel Martínez Rodríguez y Miriam Belem Rodríguez por su apoyo técnico en el laboratorio por siempre estar en la mejor disposición a ayudar y su oportuna organización para la gestión de recursos.

Al M.C. Irvin Gonzáles Lopez por sus consejos y su disposición a ayudar siempre que fue necesario, por compartir sus conocimientos y su apoyo técnico en todo momento.

Al M.C. Manuel Angel Castillo Olea ya que sin su apoyo técnico no hubiera sido posible la realización de muchos experimentos necesarios en esta investigación, pero también por

escucharme en todo momento.

Al M.C. Angel Ibarra Rodríguez ya que sin su apoyo técnico no hubiera sido posible la realización de la primera etapa para la culminación de esta investigación.

A todos aquellos que no he mencionado, pero formaron parte de mi formación profesional y me brindaron su apoyo y confianza, gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Petra Irene Saucedo Martinez y Remedios Beltran Guicho que cada quien a su manera siempre me han brindado su apoyo para lograr este objetivo en mi desarrollo profesional, por su apoyo incondicional y por el aliento que siempre me dan para continuar adelante a finalizar mis metas. Gracias a ambos por su paciencia y confianza para conseguir este gran logro en mi vida, por su amor y dedicación en todo momento, los amo y muchas gracias.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Características de <i>Salmonella</i> spp.	15
2.1.1 Morfología	15
2.1.2 Clasificación	15
2.1.3 Manifestaciones Clínicas	16
2.1.4 Epidemiología Mundial de <i>Salmonella</i> spp.	17
2.1.5 Epidemiología de <i>Salmonella</i> spp. en México.....	18
2.1.6 Tratamiento	19
2.2 Patogenicidad de <i>Salmonella</i>	19
2.3 Virulencia de <i>Salmonella</i>	20
2.4 Reservorios y Fuentes de Infección.....	22
2.5 Métodos de Detección y Aislamiento.....	24
2.6 Análisis Genómicos.....	25
3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo General	28
4.2 Objetivos Específicos	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Recolección de Muestras de Heces de Animales	29
5.2 Aislamiento de <i>Salmonella</i> en Heces de Animales	30
5.2.1 Etapa de Pre-Enriquecimiento	31
5.2.2 Enriquecimiento Selectivo.....	32
5.2.3 Aislamiento de <i>Salmonella</i>	32
5.2.4 Identificación Bioquímica.....	32
5.2.5 Conservación de los Aislados de <i>Salmonella</i>	33
5.3 Identificación Molecular de <i>Salmonella</i>	33
5.3.1 Extracción del Material Genético	34

CONTENIDO (continuación)

5.3.2 Condiciones para PCR	34
5.3.3 Electroforesis en Gel de Agarosa	34
5.4 Secuenciación de Genomas	35
5.4.1 Preparación de la Biblioteca Genómica y Secuenciación de Lectura Larga	35
5.4.2 Procesamiento y Ensamble del Genoma.....	36
5.4.3 Serotipificación <i>in silico</i>	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1 Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en Heces de Animales.....	38
6.2 Confirmación de Cepas de <i>Salmonella</i>	39
6.3 Secuenciación, Ensamble y Anotación De Genomas.....	43
6.4 Diversidad de Serotipos de <i>Salmonella</i> Aislados.....	43
6.5 Visualización de los Genomas Aislados de <i>Salmonella</i>	46
6.5.1 Anotación del Genoma de <i>Salmonella enterica</i> Serotipo Typhimurium.....	46
6.5.2 Anotación de <i>Salmonella enterica</i> Weltevreden	49
6.5.3 Anotación de <i>Salmonella enterica</i> Serovariedad Havana.....	55
6.5.4 Anotación de <i>Salmonella enterica</i> Serovariedad Sandiego.....	57
6.6 Identificación <i>in silico</i> de Genes de Resistencia a Antibióticos.....	58
6.7 Caracterización de los Factores de Virulencia	60
7. CONCLUSIONES.....	62
8. RECOMENDACIONES.....	63
9. REFERENCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de métodos empleados para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp de muestras fecales de animales domésticos	31
2. Cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas por método de aislamiento.....	41
3. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica Typhimurium (Cepa H3) con el servidor PATRICBRC.	47
4. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serotipo typhimurium (cepa H26) con el servidor PATRICBRC.	48
5. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Weltevreden (cepa H4) con el servidor PATRICBRC.	50
6. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Weltevreden (Cepa H25) con el servidor PATRICBRC.	51
7. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Weltevreden (Cepa H31) con el servidor PATRICBRC.	52
8. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Weltevreden (Cepa H36) con el servidor PATRICBRC.	53
9. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Weltevreden (Cepa H39) con el servidor PATRICBRC.	54
10. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad Havana (Cepa H44) con el servidor PATRICBRC.....	56
11. Genoma anotado de <i>Salmonella</i> enterica serovariedad San diego (Cepa H49) con el servidor PATRICBRC.....	57
12. Mapa de calor de los genes de resistencia identificados mediante CARD.....	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Coordenadas de latitud y longitud de cada sitio de toma de muestra para la recuperación de heces de animales de granja .	33
2. Resultados de muestras presuntivas para <i>Salmonella</i> aisladas de heces de animales	39
3. Lista de aislados positivos para <i>Salmonella</i> ..	42
4. Confirmación de <i>Salmonella</i> en muestras de heces mediante PCR en punto final.	43
5. Estructura Genómica de cepas de <i>S. enterica</i> aisladas de cerdo.	44
6. Serotipificación <i>in silico</i> de las cepas de <i>Salmonella</i> secuenciadas.	44
7. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> Typhimurium	48
8. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> Weltevreden	55
9. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> Havana.	56
10. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de <i>Salmonella</i> Sandiego.	58

RESUMEN

Las bacterias del género *Salmonella* son uno de los principales microorganismos causantes de infecciones gastrointestinales en los humanos con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo. El género *Salmonella* se compone de dos especies, *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*; de esta última se reportan más de 2600 serotipos capaces de infectar a humanos y animales de sangre fría y caliente, razón por la cual *Salmonella enterica* se encuentra en una vigilancia epidemiológica mundial. En México, la circulación de serotipos de *Salmonella* es alta, y Sinaloa se encuentra en los primeros lugares de prevalencia de salmonelosis, por lo que su aislamiento y caracterización ayudará a conocer los serotipos más prevalentes en la región. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Salmonella* de heces de animales de granja en la región del Valle de Culiacán. El análisis consistió en 77 muestras de heces de animales de granja que corresponden a 36 de vaca, 14 de gallina y 27 de cerdo y fueron recolectadas en seis sitios de muestreo en el período de diciembre de 2019 a marzo de 2021. Como resultados, se obtuvieron colonias presuntivas utilizando medios de cultivo semi-selectivos y selectivos. La confirmación de las colonias presuntivas de *Salmonella* se realizó mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa y posteriormente fueron sometidas a la secuenciación del genoma completo por medio del dispositivo MinION (Oxford, Nanopore Technologies). Del total de 77 muestras analizadas el 32.4% (25/77) fueron positivas para *Salmonella* y se identificaron 4 serovariedades, donde *S. Weltevreden* (25%), *S. Thipymurium* (14%), *S. Havana* (12%) y *S. Sandiego* (11%) fueron los serotipos más frecuentes. Los nueve aislados seleccionados para secuenciación tuvieron un tamaño de genoma entre 4,941,109 a 5,583,603 pb y un contenido de G+C de 48-52%. Con un tamaño del genoma desde 4,941,109 a 5,583,603 pb y un contenido de G+C 48-52%. Se encontraron 34 genes de resistencia antimicrobiana en los 9 genomas y a su vez, todos los serotipos presentaron las islas de patogenicidad SPI-1, SPI-2 y SPI-3. Este estudio proporciona información sobre la distribución de la población de *Salmonella* en animales de granja, así como la generación de registros de los serotipos circulantes en la región y su contenido genético.

Palabras clave: *Salmonella*, heces de animales, zoonosis, WGS, genes de virulencia, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT

The species of the *Salmonella* genus are one of the main microorganisms with the highest morbidity and mortality in the world. Thus, *Salmonella* infections represent a major concern to public health, animals, and the food industry worldwide. *Salmonella* genus is made up of two species, *Salmonella bongori*, and *Salmonella enterica*; of the latter, more than 2,600 serotypes are reported, many of them capable of infecting, in addition to humans, cold- and warm-blooded animals. In Mexico, the circulation of zoonotic *Salmonella* serotypes is high, and Sinaloa is among the most prevalent states with the salmonellosis disease. Therefore, the present study aimed to isolate and characterize *Salmonella* strains from animal feces. To achieve this objective, stool samples from three animals (cows, chickens, and pigs) taken at six sampling sites in the Culiacan Valley, Mexico, from December 2019 to March 2021 were analyzed. Molecular analysis was performed using the polymerase chain reaction test, and strains confirmed as *Salmonella* were subjected to whole-genome sequencing using the MinION device. A total of 77 animal feces were evaluated for *Salmonella* spp., of which 32.4% (25/77) were positive, and 9 serotypes were identified, being *Salmonella Weltevreden* (25%), *Salmonella Typhimurium* (14%), *Salmonella Havana* (12%) and *Salmonella San Diego* (11%) were the most frequent serotypes. With a genome size from 4,941,109 to 5,583,603 bp and a G+C content of 48-52%. *Salmonella Weltevreden* was the dominant serotype in the Culiacán Valley. Antimicrobial resistance genes were found in the nine genomes; in turn, all serotypes presented the pathogenicity islands SPI-1, SPI-2, and SPI-3. This study provides information on the prevalence of *Salmonella* in domestic animals and the generation of records of the *S. enterica* serotypes circulating in the region. The presence of animal reservoirs may be critical to understanding the transmission routes of *Salmonella* in areas of high disease prevalence.

Key words: *Salmonella*, animal faeces, zoonoses, antibiotic resistance, virulence genes.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria patógena anaerobia facultativa, Gram-negativa, de importancia ambiental en todo el mundo, considerada como uno de los principales patógenos zoonóticos causantes de infecciones gastrointestinales en humanos (Coburn *et al.*, 2007; CDC, 2019). *Salmonella* se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente como el agua de ríos, mares, lagos, suelos; así también, se encuentra en animales como el tracto gastrointestinal de mamíferos domésticos y silvestres, aves, reptiles e insectos (Sanchez, 2003; Haley *et al.*, 2009). El género *Salmonella* se compone de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* y actualmente se han identificado más de 2600 serotipos. Los serotipos de mayor relevancia pertenecen a la especie *enterica*, asociados frecuentemente con la mayoría de los casos de salmonelosis (Guibourdenche *et al.*, 2010).

La salmonelosis es la enfermedad causada por la *Salmonella*. Entre los síntomas de dicha enfermedad se encuentran náuseas, vómito, dolores abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza. La enfermedad se autolimita de 4 a 7 días después del inicio de los síntomas; sin embargo, en algunos casos se pueden presentar complicaciones que requieren hospitalización (Hohmann, 2001; CDC, 2020). La salmonelosis se asocia comúnmente con el consumo de alimentos y agua que se encuentren contaminados con el microorganismo; sin embargo, el contacto directo con este patógeno también representa una fuente de infección, lo que propicia la dispersión y el mantenimiento del ciclo de infección (Eng *et al.*, 2015; EFSA, 2021).

En general, *S. enterica* puede encontrarse en una variedad de vertebrados, incluyendo seres humanos, mascotas, animales salvajes, animales de granja, aves silvestres y reptiles (Hoelzer *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2019; CDC, 2020). Esta bacteria se transporta de forma asintomática en el intestino o la vesícula biliar de muchos animales y es excretada de forma intermitente a través de las heces (Gunn *et al.*, 2014). Los animales pueden transmitir bacterias patógenas a los humanos, por lo tanto, la vigilancia de patógenos es fundamental para controlar estas infecciones (Kruse *et al.*, 2004).

La identificación y caracterización de los serotipos de *Salmonella* se lleva a cabo por medio de métodos de tipificación molecular, incluido la tipificación de secuencias de múltiples enfoques o métodos basados en PCR y la electroforesis en gel de campo pulsado, así como para diferenciar los aislados de *S. enterica* (Swaminathan *et al.*, 2001; Malorny *et al.*, 2008). Sin embargo, estos métodos no brindan información sobre el genoma completo, lo cual es crucial para comprender la biología de *Salmonella*. La secuenciación del genoma completo, seguida de un análisis comparativo del genoma, se utilizan para dilucidar las relaciones evolutivas de las especies bacterianas, su variación genética y la identificación de los determinantes de la resistencia a los antibióticos o de virulencia (Smith *et al.*, 2012; Bentley y Parkhill, 2015; Nadon *et al.*, 2017).

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de heces de animales de granja en el Valle de Culiacán, así como identificar sus factores de patogenicidad utilizando la secuenciación del genoma completo (WGS) de los aislados mediante un análisis genómico comparativo profundizando así en el entendimiento de este patógeno en la región.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de *Salmonella* spp.

2.1.1 Características Generales

El primer informe sobre la observación de *Salmonella* fue hecho en 1880 por el patólogo alemán Karl Eberth. *Salmonella* fue cultivada por primera vez en 1884 por Georg Gaffky. En 1885 Theobald Smith junto con Daniel Elmer Salmon aislaron a *Salmonella* de los intestinos de cerdos infectados con peste porcina clásica (Le Minor *et al.*, 1991; D'Aoust, 1989). A partir de entonces se ha realizado la clasificación de las bacterias pertenecientes al género de *Salmonella* (Eng *et al.*, 2015). En la actualidad se clasifica el género *Salmonella* en dos especies en función de las diferencias en su análisis de secuencia de ARNr 16S. Estas dos especies son *S. enterica* y *S. bongori*.

2.1.2 Morfología

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas y con una apariencia de bacilos cortos con dimensiones que oscilan entre $0.2-1.5 \times 2-5 \mu\text{m}$. Las bacterias presentan una alta motilidad debido a la presencia de flagelos peritricos, y para su crecimiento requieren de un rango de temperatura entre los $7^\circ\text{C} - 48^\circ\text{C}$ y un pH entre 4 y 8 (Miller y Pegues, 2000; Grimont y Weill, 2007).

2.1.3 Clasificación

Las especies de *Salmonella* se clasifican sobre la base de las propiedades bioquímicas y la relación

genómica (Reeves *et al.*, 1989). El género consta de dos especies: *bongori* y *enterica*, esta última está dividida en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Brenner *et al.*, 2000). De todas las subespecies de *Salmonella* destaca la subespecie *enterica*, siendo la más común y se encuentra predominantemente asociada con mamíferos y se le atribuye aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente (Grimont y Weill, 2007). *S. enterica* está representada por más de 2,600 serotipos; que en conjunto, generan anualmente millones de infecciones que varían desde una gastroenteritis aguda hasta fiebre tifoidea (serotipos Typhi y Paratyphi A y B) en los seres humanos (Grimont y Weill, 2007). Por otro lado, las otras cinco subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* son raras en los humanos y se encuentran principalmente en animales de sangre fría y el medio ambiente (Brenner *et al.*, 2000).

El sistema de clasificación de Kauffman y White es otro sistema existente, además de la clasificación de subespecies basada en la filogenia (Kauffmann, 1941; White, 1925). Este esquema clasifica a *Salmonella* en serotipos sobre la base de tres determinantes antigénicos principales, que incluyen a los antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H) (Brenner *et al.*, 2000). El antígeno somático (O) se encuentra en la membrana celular bacteriana externa, es estable al calor y forma el componente oligosacárido del lipopolisacárido (LPS) de las células bacterianas. Los antígenos H termolábiles están involucrados en la activación de las respuestas inmunes del huésped y se encuentran principalmente en los flagelos bacterianos. Los antígenos K de superficie son polisacáridos sensibles al calor ubicados principalmente en la superficie capsular bacteriana (Guibourdenche *et al.*, 2010).

2.1.4 Manifestaciones Clínicas

Las cepas de *Salmonella* se pueden agrupar en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea (NTS). En las infecciones humanas, las manifestaciones clínicas son fiebre entérica y gastroenteritis (Sheorey y Darby 2008). La fiebre entérica es causada por *Salmonella* Typhi es el agente etiológico de la fiebre tifoidea, mientras que la fiebre paratifoidea está causada por *S. Paratyphi* A, B y C. Dado que los síntomas clínicos de la fiebre paratifoidea son indistinguibles de los de la fiebre

tifoidea, el término "fiebre entérica" se utiliza para ambas fiebres (Connor y Schwartz, 2005). Los seres humanos son el único reservorio de las dos cepas de *Salmonella* tifoidea. La fiebre entérica se caracteriza por un período de incubación de una semana o más, con síntomas como dolor de cabeza, dolor abdominal y diarrea, seguido de la aparición de fiebre (Bhan *et al.*, 2005).

Las infecciones por NTS se caracterizan por gastroenteritis, una afección inflamatoria del tracto gastrointestinal que se acompaña de síntomas como diarrea sin sangre, vómitos, náuseas, dolor de cabeza, calambres abdominales y mialgias. Los síntomas son principalmente autolimitados y suelen presentarse entre 2 a 7 días (Hohmann, 2001; Crump *et al.*, 2008). Las complicaciones gastrointestinales de las infecciones por NTS incluyen colecistitis, pancreatitis y apendicitis (Hohmann, 2001). Los bebés, los niños pequeños, los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos son muy susceptibles a las infecciones por NTS y desarrollan síntomas más graves que las personas normales (Scallan *et al.*, 2011).

2.1.5 Epidemiología Mundial de *Salmonella* spp.

Las bacterias del género *Salmonella* han sido reconocidas como uno de los patógenos líderes causantes de enfermedades diarreicas por el consumo de alimentos a nivel mundial (EFSA, 2021). La salmonelosis es un problema importante a nivel mundial; esta se asocia con altos índices de morbilidad, no solo en países en vías de desarrollo como México, sino también en países industrializados, pero los índices de mortalidad más altos se encuentran en las naciones en vías de desarrollo (Amábile, 2010).

En los Estados Unidos de América, durante el 2019 se reportaron aproximadamente 1,200,000 casos de infecciones por *Salmonella* no tifoidea, de los cuales, 23,000 terminaron en hospitalizaciones y 450 en defunciones (CDC, 2020). La mayoría de los casos de salmonelosis no se reportan o simplemente no se diagnostican. Aun así, los costos asociados con salmonelosis suman millones de dólares anualmente en Estados Unidos, sin contabilizar los costos de hospitalización, la pérdida de productividad laboral, el retorno de productos contaminados

asociados a brotes y el cierre de fronteras a la importación de los productos asociados al brote. Esto conlleva un aumento en los costos de la enfermedad que se contabilizan en varios miles de millones de dólares en el periodo que dura la contingencia sanitaria (Scallan *et al.*, 2011). En 2018 se reportaron 16 brotes de enfermedad ocasionados por *Salmonella* en Estados Unidos de América relacionados con el consumo de alimentos contaminados. En 2019 se reportaron 10 brotes por *Salmonella*, de los cuales, 7 fueron relacionados con alimentos contaminados y los restantes por el contacto con animales (CDC, 2019). En la Unión Europea (UE) se reporta a la salmonelosis como la segunda causa de infección gastrointestinal, y en 2019 se reportaron un total 87,923 casos (ECDC, 2021).

2.1.6 Epidemiología de *Salmonella* spp. en México

En México, la Dirección General de Epidemiología (DGE) por medio del Boletín Epidemiológico del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), el cual se encarga de la generación de información epidemiológica de todo el país, reporta alrededor de 70,000 casos de salmonelosis cada año y están incluidos dentro de las enfermedades diarreicas, las cuales están consideradas como una de las principales causas de muerte en infantes menores de 5 años (Zaidi *et al.*, 2008; DGE, 2017). En México no existen datos exactos referentes a costos, pero datos preliminares del SINAVE de los casos de salmonelosis hasta la semana 52 del año 2021 estimaron un total de 42,211, sin incluir las enfermedades no reportadas o mal diagnosticadas (SINAVE, 2022). En Sinaloa se reportaron 1,832 casos de salmonelosis, lo cual coloca al estado en el sexto lugar en incidencia de este padecimiento (SINAVE, 2022).

Contreras-Soto y colaboradores (2019), han reportado la presencia de 216 serotipos de *Salmonella enterica* circulando en México. Los serotipos Oranienburg, Anatum, Arizonae y Typhimurium son los más prevalentes en los animales los cuales ocupan el segundo lugar como fuente de aislamiento (23.42%) de la bacteria, siendo el ganado vacuno (10.14%), aves de corral (5.63%) y cerdos (3.38%) los animales con la más alta prevalencia. Lo anterior nos indica la diversidad de serotipos que existen en el país, así como la elevada prevalencia de infecciones reportadas anualmente en la

región, por lo que es de gran importancia seguir estudiando las especies de *Salmonella* que circulan en nuestro país.

2.1.7 Tratamiento

Los pacientes con salmonelosis usualmente se recuperan sin necesidad de una terapia antimicrobiana debido que generalmente esta gastroenteritis es autodelimitada. La enfermedad tiene un lapso de síntomas entre 3 y 7 días y solo se recomienda una buena reposición de electrolitos (Miller y Pegues, 2005). Sin embargo, cuando se presenta una salmonelosis aguda y los síntomas son prolongados se recomienda el tratamiento antimicrobiano con los fármacos como ampicilina, amoxicilina, cloranfenicol y trimetoprima con sulfametoxazol (Miller y Pegues, 2005).

2.2 Patogenicidad de *Salmonella*

Las infecciones en humanos ocasionadas por *Salmonella* comienzan cuando la dosis infectiva es ingerida por medio de agua o alimentos contaminados. Los microorganismos ingeridos pasan al estómago y aquellos que logran sobrevivir al pH del medio se mueven al intestino delgado donde empiezan a competir con la microbiota del hospedero por nutrientes y espacio (Giannella, 1996). Esta bacteria comienza penetrando la barrera intestinal e interactúa con células del sistema inmune donde actúa como parásito intracelular, esto requiere la presencia de factores de virulencia para que el proceso infeccioso se lleve a cabo (López *et al.*, 2012). Esto lo logra mediante un mecanismo conocido como disparo, donde la bacteria envía señales a las células epiteliales induciendo rearrreglos en el citoesqueleto para la formación de ondulamientos en la superficie (Figuroa y Verdugo, 2005). Después de la invasión al epitelio, la bacteria se multiplica intracelularmente llegando a los ganglios linfáticos donde se distribuye a todo el cuerpo por medio del sistema circulatorio (Jones, 1997). Dependiendo del serotipo y de la capacidad invasiva que este tenga en el hospedero humano, puede causar daños en el hígado, vesícula, entre otros 35 órganos (Giannella, 1996).

Una vez que *Salmonella* ha invadido el intestino se puede desencadenar una respuesta inflamatoria, dando lugar a la formación de úlceras (Figueira y Holden, 2012). En cada paso del proceso infeccioso este patógeno responde a los cambios en su entorno mediante la expresión de ciertos genes que le permiten sobrevivir a las condiciones desfavorables (Jones, 1997). A estos genes se les conoce como factores de virulencia y en esencia le confieren a *Salmonella* la habilidad patogénica para que pueda llevar a cabo una enfermedad; ya sea por la función en conjunto o individual de los genes. Estos factores están involucrados en interacciones con el tejido del huésped o en mecanismos de defensa y tienen como función primordial la colonización del hospedero, la inhibición del sistema inmunológico y la evasión de la respuesta inmune (Wu *et al.*, 2008).

2.3 Virulencia de *Salmonella*

La capacidad de una bacteria para causar una enfermedad es debido a la expresión de los factores de virulencia, que le permiten a un organismo establecerse en un huésped humano y desencadenar una enfermedad (Chen *et al.*, 2012). Se ha demostrado que muchos factores de virulencia desempeñan una variedad de funciones en la patogenia de las infecciones por *Salmonella*. Estos factores incluyeron flagelos, cápsulas, plásmidos, sistemas de adhesión y sistemas de secreción tipo 3 (T3SS) codificados en la isla de patogenicidad de *Salmonella* SPI-1 y SPI-2 y otras islas de patogenicidad (Daigle, 2008; Sabbagh *et al.*, 2010).

El sistema de secreción tipo III (T3SS) se encuentra en bacterias Gram-negativas, permite la translocación de proteínas efectoras bacterianas dentro de la célula huésped (Cabañas-Romero y Huerta-Saquero, 2014; Galán *et al.*, 2014). Fue identificado originalmente en *Salmonella* Typhimurium, pero se ha identificado que es codificado por otras bacterias (Blocker *et al.*, 2001). La bacteria secreta proteínas translocatorias que se introducen en la membrana de la célula huésped para la formación de un poro que permite la transferencia de otras proteínas necesarias por el patógeno (Lee *et al.*, 2014). Su función principal es inyectar proteínas bacterianas denominadas efectoras, las cuales pasan al citoplasma del hospedero y estas a su vez afectan la señalización intracelular, la dinámica del citoesqueleto y el tráfico vesicular de la célula a favor del patógeno.

Esta fase en la patogenicidad de *Salmonella* constituye un paso importante para el desarrollo de la enfermedad en el huésped (Molina *et al.*, 2017). Este es un sistema complejo que se compone de más de 20 proteínas estructurales y se encuentra parcialmente conservado en *Salmonella enterica*, por lo que la estructura se encuentra generalizada en toda esta subespecie (Gonzales-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Los factores de virulencia incluyen proteínas de adhesión a una superficie celular, toxinas, enzimas hidrolíticas, carbohidratos y proteínas (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009). *Salmonella* utiliza un sistema de genes de virulencia contenidos en agrupamientos denominados islas de patogenicidad (SPIs) para ayudar a la bacteria a invadir, replicarse y sobrevivir en el hospedero (Marcus *et al.*, 2000). La mayoría de las islas de patogenicidad de *Salmonella* se encuentran adyacentes a genes de ARNt, y difieren entre islas en el contenido G+C; esto sugiere que fueron adquiridas por procesos de transferencia horizontal (Amavisit *et al.*, 2003). Se han identificado 23 islas de patogenicidad, de las cuales, cinco (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5) se encuentran bien definidas y son los más comunes dentro de todos los serovares de *S. enterica*, mientras que las demás están distribuidas en diferentes serovares y/o cepas (Espinoza *et al.*, 2017).

En particular, la isla de patogenicidad uno (SPI-1) codifica para el sistema de secreción tipo III, que sirve para translocar proteínas efectoras a una célula eucariótica. Estas proteínas median la invasión de las células no fagocíticas por *Salmonella*, proceso que involucra la modificación del citoesqueleto (Galán, 2001). La funcionalidad de las proteínas codificadas por los genes pertenecientes a esta isla se ha identificado mediante la inserción de mutaciones. Por ejemplo, Lostroh y Lee (2001), identificaron el gen *invA*, siendo el responsable de la invasión de este patógeno a células epiteliales. Estos genes se expresan en respuesta a las señales percibidas por la bacteria en el intestino del hospedero infectado (Figueira y Holden, 2012).

La isla de patogenicidad dos (SPI-2), se compone de dos elementos distintos: el segmento más grande de 25 kb es esencial para desencadenar la patogenicidad (se encuentra solamente en *S. enterica*) y codifica para genes del sistema de secreción tipo tres (T3SS), sistema regulatorio, sistema de chaperonas y sistemas efectores (Hensel, 2004); y el segmento pequeño de 15 kb es responsable de la virulencia sistemática y codifica para 5 genes *ttr*, los cuales son responsables de la utilización del tetratoato como aceptor de electrones para la respiración anaerobia de la bacteria (Hensel, 2000).

La isla de patogenicidad tres (SPI-3) tiene un tamaño de 17 kb (con un porcentaje de G-C del 39.3) su distribución varía entre las cepas de *Salmonella*, pero todas tienen conservado el gen *mgtC* y son un elemento importante para la supervivencia intracelular en macrófagos y provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones bajas de Mg^{2+} (Hasel, 2044; Adelantado *et al.*, 2008).

El papel de la isla de patogenicidad cuatro (SPI-4) en la virulencia todavía no se ha analizado completamente (Hensel, 2004); sin embargo, Kiss y colaboradores (2007), han determinado que la pérdida de esta isla atenúa la virulencia de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* en ratones. SPI-4 se compone de aproximadamente 6 genes, los cuales se han designado como *siiA-F* por ser genes que propician una infección intestinal (Kiss *et al.*, 2007).

Por otra parte, la isla de patogenicidad cinco (SPI-5) fue identificada por primera vez en *Salmonella* Dublin y consta de cinco genes denominados *pipA*, *pipB*, *pipC*, *sopB* y *pipD*. Codifica proteínas efectoras involucradas en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, como SopB y se encuentra involucrada en el flujo de macrófagos además codifica efectores de SPI-1 y SPI-2 (Adelantado *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2014).

2.4 Reservorios y Fuentes de Infección

Los seres humanos están expuestos a bacterias del género *Salmonella* por distintas fuentes de contaminación, ya sea por medio de los alimentos o las vías ambientales. Existen diversos animales que son reservorios para *Salmonella*, los cuales actúan como vías de dispersión al ambiente y de transmisión hacia los humanos. Estos animales normalmente transportan el patógeno de forma asintomática. Por ende, las heces de animales y humanos infectados son fuentes importantes de contaminación bacteriana del medio ambiente y la cadena alimentaria (Ponce *et al.*, 2008; Gunn *et al.*, 2014). A diferencia de *S. Typhi* y *S. Paratyphi*, cuyo único reservorio son los humanos, los serotipos causantes de salmonelosis no tifoidea cuentan con múltiples reservorios animales (Fuaci y Jameson, 2005).

En general, *Salmonella enterica* puede encontrarse en una variedad de vertebrados, aves y reptiles

(Fuaci y Jameson, 2005; CDC, 2018). En México, *Salmonella* ha sido reportada en animales, ocupando el segundo lugar como fuente de aislamiento, de los cuales, el ganado vacuno, aves de corral y porcinos presentaron la más alta prevalencia (Contreras-Soto *et al.*, 2019). Los principales serotipos encontrados fueron Oranienburg, Anatum, Arizonae y Typhimurium (Jiménez *et al.*, 2011; Cueto-Medina *et al.*, 2015).

Distintos autores reportaron la presencia de *Salmonella* en animales. Jiménez y colaboradores (2011), investigaron la prevalencia y diversidad de *Salmonella* spp. en animales domésticos en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México, donde se evaluaron 240 muestras de heces de animales de granja (vacas, pollos y ovejas) y obtuvieron el aislamiento de *Salmonella* de 76 muestras (31.7%), logrando identificar 20 serotipos, entre los que destacaron Oranienburg (25%), Give (14%), Saintpaul (12%) y Minnesota (11%). El análisis de los perfiles genéticos de serotipos de *Salmonella* mediante electroforesis en campos pulsados (PFGE, siglas en inglés) demostró que los pulsotipos de estos aislados fueron diferentes entre los hospedadores animales, y que la diversidad genética de *Salmonella* podría ser una evidencia de la exposición continua de los animales a la bacteria. Además, la adaptación de los animales asintomáticos a *Salmonella* puede estar justificada por el desarrollo de la inmunidad natural del hospedero.

Por su parte, Silva-Hidalgo y colaboradores (2012), tuvieron como objetivo determinar la prevalencia de las infecciones subclínicas de *Salmonella* no tifoidea en animales del zoológico de Culiacán, Sinaloa y los serotipos. Los autores reportaron la presencia de *Salmonella* en el 11.6% de las muestras de heces de mamíferos, aves y reptiles cautivos, así como roedores e insectos que viven en estrecho contacto con los animales del zoológico. Encontraron a los serotipos Sandiego, Oranienburg, Weltevreden, Braenderup y Derby. El análisis intraserotipo mediante PFGE mostró cepas indistinguibles (diversidad genética no diferenciada), con alguna excepción aislada, lo cual sugiere la circulación de esta variante de *Salmonella* entre los habitantes animales en el zoológico de Culiacán, que pueden diseminarse a través de agua, alimentos, fómites o vectores como aves acuáticas y roedores.

Afema *et al.* (2016), investigaron las fuentes potenciales y la transmisión de *Salmonella* no tifoidea en Kampala, Uganda entre 2012 y 2013, logrando detectar a *Salmonella* en el 6.6% de las muestras

fecales de aves de corral y 4% de las muestras fecales de cerdos. Se obtuvieron 775 aislados de *Salmonella* y se identificaron 32 serotipos. Utilizaron electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para la obtención de huellas genéticas, detectando patrones similares entre los serotipos. En general, se encontraron genotipos compartidos de fuentes humanas, ganaderas y ambientales, lo que sugiere transmisiones zoonóticas y ambientales.

2.5 Métodos de Detección y Aislamiento

El aislamiento de *Salmonella* spp. consiste en tener una etapa de enriquecimiento no selectivo, debido a que juega un papel esencial para facilitar el crecimiento de *Salmonella* cuando las células han sufrido algún daño por estrés, seguido de un paso de enriquecimiento selectivo, siembra en agar selectivo y confirmación bioquímica y serológica de colonias presuntivas (Kyung *et al.*, 2015; Jajere, 2019). Para ello, se han publicado algunos protocolos para realizar el aislamiento y detección, por laboratorios u organizaciones con alto renombre a nivel mundial. Por ejemplo, la Organización Internacional para la Normalización (ISO), el Manual Analítico Bacteriológico (BAM-FDA) y el Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del USDA, han estandarizado diferentes enfoques de enriquecimiento de *Salmonella* utilizando las propiedades físicas y bioquímicas únicas del organismo.

El cultivo de enriquecimiento es una competencia entre la microbiota por los nutrientes disponibles y contra los inhibidores del crecimiento. Si bien los medios de enriquecimiento están diseñados para favorecer a un organismo objetivo, es posible que las condiciones no favorezcan por igual a todas las cepas o subgrupos (serotipo o serogrupo) de esa especie. Esto es especialmente importante cuando el organismo que se busca es un patógeno de una matriz compleja o se encuentra contaminada por más de una cepa del patógeno, es posible que se pase por alto la cepa de interés (Gorski 2012; Kyung *et al.*, 2015; Jajere 2019)

Estudios han informado que diferentes cepas de *Salmonella* tienen diferentes características de recuperación en medios de enriquecimiento que conducen a una recuperación diferencial entre

cepas de *Salmonella*. Gorski en el 2012, estudio cultivos mixtos de *Salmonella enterica* en un conjunto de medios de enriquecimiento estándar teniendo como objetivo observar si surgían patrones de sesgo de cultivo. Se analizaron diecinueve cepas diferentes de *Salmonella* las cuales representan cuatro serogrupos y diez serotipos en diferentes protocolos de enriquecimiento para *Salmonella*.

Por lo tanto, el uso de múltiples medios y métodos de enriquecimiento son factores importantes para aumentar la probabilidad de aislar cepas de *Salmonella* que puedan tener diferentes características de aptitud de cultivo en las muestras que se analizan. Esto sería especialmente crítico en investigaciones de brotes o rastreo y estudios que pueden involucrar diversos tipos de muestras (agua, heces, suelo) con microbiota nativa diversa que podría sesgar la aptitud del organismo objetivo.

2.6 Análisis Genómicos

La secuenciación de nueva generación es un grupo de tecnologías que nos permiten obtener una gran cantidad de genomas y en menor tiempo. Esto ha revolucionado el campo de la genómica y ha permitido realizar análisis de manera más sencilla y eficaz (Lander, 2011; Green y Guyer, 2011). El desarrollo de nuevas tecnologías y plataformas para secuenciar genomas completos de bacterias individuales ha permitido avanzar en nuestra comprensión de la evolución de las especies y examinar con detalle las características específicas de las bacterias (Deng *et al.*, 2003).

El genoma brinda, en principio, el catálogo completo de genes que contiene un organismo, pero la interpretación de esta información a todos los niveles (desde el enorme volumen de datos originados por el secuenciador, hasta los miles de genes identificados en paralelo asociados con diversas funciones), constituye un gran reto desde el punto de vista computacional. El ensamblaje *de novo* es uno de los procedimientos empleados para reconstruir genomas (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015). Después del ensamblaje del genoma, el próximo paso consiste en interpretar la información que contiene. Para ello, es necesaria la identificación de las principales características

del genoma, proceso conocido como anotación. La anotación de genomas comprende dos etapas fundamentales: la anotación estructural (predicción de regiones codificantes) y la anotación funcional cuando ésta existe (asignación de información biológica a los genes previamente predichos).

Los métodos para la anotación estructural en un genoma se dividen en dos categorías: método “*de novo*” y método por comparación con un genoma de referencia (Harrow *et al.*, 2009). El método *de novo* utiliza algoritmos estadísticos o de reconocimiento de patrones para determinar si la secuencia de interés es codificante o no, mediante la detección de patrones o motivos específicos en la secuencia. Por otro lado, el método por comparación a una secuencia de referencia identifica zonas de alta similitud en organismos relacionados o en bases de datos de proteínas para reconocer las regiones codificantes. Sin embargo, este método es menos exitoso en la identificación de nuevos genes y en nuevos organismos, ya que las bases de datos están sesgadas hacia los genes altamente expresados en los organismos más estudiados (Aguilar-Bultet y Falquet, 2015).

Los genomas de las bacterias entéricas secuenciadas coinciden con características como la presencia de un único cromosoma, frecuentemente con un tamaño de 4.3-5.0 Mb y cuenta con un contenido de GC desde 50-52% (Baker y Dougan, 2007; Deng *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2015). Adicionalmente, se han reportado cepas que además pueden tener ADN extracromosómico en forma de plásmidos (Baker y Dougan, 2007).

3. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

1. Los principales serotipos de *Salmonella* presentes en muestras fecales de vacas, cerdos y gallinas en el Valle de Culiacán incluyen a *S. Minnesota*, *S. Oranienburg*, *S. Saintpaul* y *S. Give*.
2. Diferentes serotipos de *Salmonella* serán identificados de acuerdo a su método de aislamiento.
3. Existen diferencias en el contenido de genes relacionados con la virulencia y resistencia antimicrobiana entre los serotipos aislados.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

1. Determinar la prevalencia y factores de patogenicidad de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de heces de animales de granja.

4.2 Objetivos Específicos

1. Aislar *Salmonella* spp. utilizando diferentes métodos selectivos e identificar serotipos de *S. enterica* de muestras de heces de animales.
2. Caracterizar el contenido genético de los aislados de *Salmonella* involucrado en la resistencia antimicrobiana y virulencia de cepas de *S. enterica*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Recolección de Muestras de Heces de Animales

En este estudio se analizaron 77 muestras de heces de animales de granja (vacas, gallinas y cerdos) localizados en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. La recolección de muestras se realizó en 6 granjas rurales una por cada sitio de muestreo cercanos al río Culiacán y áreas agrícolas del Valle de Culiacán, específicamente en el municipio de Navolato. La toma de muestra se realizó en La laguna (A), La curva (B), Las ilusiones (C), San Pedro 2 (D), San pedro 1 (E), Punto F (F) (Cuadro 1), la recolección de muestras de heces frescas de vacas, gallinas y cerdos se realizó de acuerdo con su disponibilidad en los sitios de muestreo. La toma de la muestra consistió en recolectar aproximadamente 100 g de material fecal fresco usando una espátula y un guante estéril y se depositó en una bolsa de plástico estéril etiquetada.

Una vez tomadas las muestras se trasladaron al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIA) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), coordinación Culiacán. Las muestras se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4 °C para su posterior procesamiento dentro de las primeras 6 h después de la toma de muestras. Las muestras se colectaron con una frecuencia quincenal durante 3 meses.

Cuadro 1. Coordenadas de latitud y longitud de cada sitio de toma de muestra para la recuperación de heces de animales de granja.

Lugar de toma de muestra	Fuente Heces	Latitud del sitio de muestreo	Longitud del sitio de muestreo
La laguna	Vaca	24.771696	-107.592726)
La curva	Vaca	24.720561	-107.596190
	Cerdo		
	Gallina		
Las Ilusiones	Vaca	24.718056	-107.542793
	Cerdo		
	Gallina		
San Pedro 2	Cerdo	24.777043	-107.547241

	Vaca		
San Pedro 1	Vaca	24.777020	-107.562421
	Cerdo		
	Gallina		
Punto F	Cerdo	24.786815	-107.546311
	Vaca		

5.2 Aislamiento de *Salmonella* en Heces de Animales

El aislamiento se realizó empleando dos caldos de pre-enriquecimiento; agua de peptona tamponada (BPW) y caldo soya tripticaseína (TSB) para promover el crecimiento de *Salmonella* spp. dado que se ha documentado un sesgo de cultivo en la recuperación de *Salmonella* spp. a partir de muestras ambientales (Gorski, 2011) (Figura 1). Además, se emplearon tres caldos de enriquecimiento selectivo; Rappaport–Vassiliadis R10 (RV) (Difco™ Rappaport-Vassiliadis, R10 Broth), caldo Muller-Kauffmann Tetrathionato (Difco™ Muller Kauffmann Tetrathionate Broth Base) y caldo Selenito-Cistina (BBL Selenite Cystine Broth) con la finalidad de aumentar y mejorar la recuperación de *S. enterica* de las muestras fecales recolectadas.

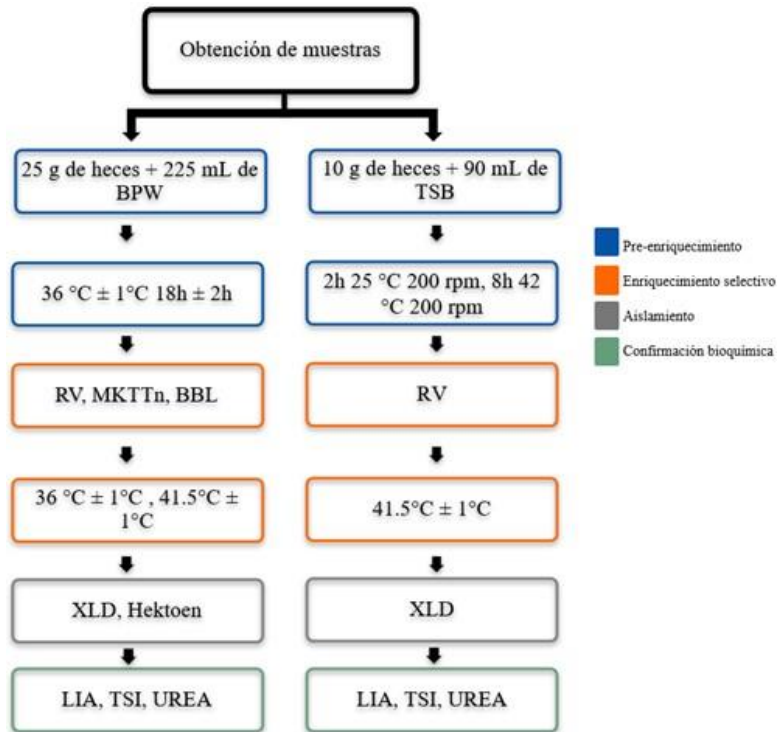


Figura 1. Diagrama de métodos empleados para el aislamiento de *Salmonella* spp. de muestras fecales de animales domésticos. Detección, aislamiento y confirmación bioquímica de *Salmonella*.

5.2.1 Etapa de Pre-Enriquecimiento

La etapa de pre-enriquecimiento se llevó a cabo como lo estipula la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 y adicionalmente, siguiendo las metodologías propuestas por Gorski (2013) y Rangel-Vargas (2015) (Figura 1).

Se tomaron 25 g de heces y se le colocaron 225 mL de agua de peptona tamponada (Difco™ Buffered Peptone Water) y se mezclaron vigorosamente antes de incubarse a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ (NOM-210-SSA1-2014). Adicionalmente, se tomaron 10 g de heces y se colocaron en 100 mL de caldo soya tripticaseína (TSB) y se mezclaron antes de incubarse a 25 °C durante 2 h, luego a 42 °C durante 8 h con agitación a 200 rpm y las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta la mañana siguiente (Gorski, 2013; Rangel-Vargas, 2015).

5.2.2 Enriquecimiento Selectivo

La fase de enriquecimiento selectivo se llevó a cabo utilizando tres caldos distintos para cada una de las muestras, con el fin de aumentar el crecimiento de *Salmonella* spp. e inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Figura 1). Se transfirieron 10 mL de caldo de enriquecimiento a tres tubos de cultivo estériles (1 tubo por cada caldo). A cada caldo se añadió 1 mL de la muestra previamente incubada y se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$ para el caso de los caldos Selenito-Cistina y caldo Muller-Kauffmann Tetracionato, mientras que a los tubos con caldo Rappaport–Vassiliadis se les añadieron 100 μL de la muestra y se incubaron a $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 2\text{h}$.

Se transfirieron 100 μL del cultivo de TSB resultante a otro tubo que contenía 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis en tubos de ensayo de 16x150 mm que se insertaron en gradillas inclinadas y se incubaron a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación (150 rpm) durante 24 h.

5.2.3 Aislamiento de *Salmonella*

Después del periodo de incubación del paso previo (enriquecimiento) a cada caldo de cultivo que presentó crecimiento se le tomó una muestra con un asa estéril y se estrió en una caja Petri con agar xilosa-lisina-desoxicolato (agar XLD, Bioxón, México) como principal medio de cultivo para el aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. y agar enterico Hektoen (Bioxón, México). Las placas se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h, seguido de subcultivos de colonias con características morfológicas consistentes con *Salmonella* spp. (colonias transparentes con el centro negro) hasta su completo aislamiento.

5.2.4 Identificación Bioquímica

Las colonias presuntivas de *Salmonella* se seleccionaron del medio selectivo XLD y Hektoen y se

realizó la siembra en medio TSA y se incubó durante 24 h a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la identificación bioquímica utilizando Agar-Hierro-Lisina (LIA), agar hierro y triple azúcar (TSI) y caldo Urea. Para los medios de LIA y TSI se sembró mediante el método de punción con aguja bacteriológica, mientras que el caldo de urea se inoculó una colonia presuntiva utilizando un asa bacteriológica y posteriormente se dejaron incubar los tubos a 37 °C por 24 h. En LIA, *Salmonella* spp. produce reacción alcalina (color púrpura), en TSI por lo general *Salmonella* da como resultado una reacción alcalina/ácida con producción de ácido sulfhídrico donde queda en el fondo un color negro en el tubo y para el caldo urea *Salmonella* no tiene la capacidad de hidrolizar urea, por lo tanto, no se produce cambio en la coloración. s

5.2.5 Conservación de los Aislados de *Salmonella*

La conservación de los aislados presuntivos de *Salmonella* consistió en realizar una preservación directa en la cual se añadieron 500 µL de TSB-glicerol al 30% (v/v) en tubos de 2 mL. Posteriormente, se realizó un arrastre de colonias con un asa previamente estéril y se inoculó en el tubo. Este procedimiento se realizó con cada una de las cepas. Finalmente, los tubos inoculados se colocaron a -20 °C hasta su confirmación mediante PCR.

5.3 Identificación Molecular de *Salmonella*

La confirmación de *Salmonella* se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando los oligonucleótidos que flanqueen la secuencia del gen *invA* (Sentido *Sal*1598 5'-AAC GTG TTT CCG TGC GTA AT-3') y (antisentido *Sal*1859 5'-TCC ATC AAA TTA GCG GAG GC-3') esperando un producto amplificado de 250 pb (BAM-FDA, 2003).

5.3.1 Extracción del Material Genético

El material genético de las bacterias se extrajo mediante la técnica de lisis por calor. Para la cual se tomó una colonia de bacteria y se suspendió en 55 μL de agua nanopura estéril en un tubo nuevo de 200 μL . Posteriormente, se realizó la extracción de ADN por lisis bacteriana mediante incubación en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf) durante una incubación a 95 °C durante 20 min y estabilizada a 4 °C durante 5 min. Los tubos se centrifugaron a 2,000 xg durante 5 min, se recogió el sobrenadante en un tubo estéril y se desechó el pellet. Los lisados bacterianos se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

5.3.2 Condiciones para PCR

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μL con el kit “GoTaq® Green Master Mix 2X” (Promega,USA). La amplificación del ADN bacteriano se realizó en un termociclador (Mastercycler gradient Eppendorf), con las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 5 min, posteriormente 25 ciclos a 95 °C por 1 min, 63 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Finalmente, un ciclo a 72 °C por 5 min y la reacción se estabilizó a 4 °C (BAM-FDA, 2003).

5.3.3 Electroforesis en Gel de Agarosa

Los productos de PCR obtenidos anteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para ello, se pesó 1 g de agarosa (Promega, USA) y se mezcló con 100 mL de Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Eppendorf, USA). La mezcla se disolvió en placa de calentamiento hasta obtener una solución homogénea y transparente, se dejó enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura aproximadamente de 50 °C para añadir 1 μL de 10 mg/mL de Gel Red® Nucleic Acid Stain (Sigma-Aldrich), enseguida se vertió sobre su respectivo molde y se dejó solidificar.

De cada producto de PCR se inocularon 2 μ L y se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Promega, USA) como patrón de referencia para determinar el tamaño molecular del producto del gen *InvA* amplificado.

Se utilizó una cámara de electroforesis Thermo EC 230 con una fuente de poder (Thermo EC 150) a un voltaje de 75 mV durante 70 min. Una vez efectuada la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en un transiluminador (Gel DocTM XR, Gel Imaging System, Bio-Rad). La prueba se consideró positiva, cuando se observó una banda de 250 pb. En todos los experimentos se contó con un control positivo (lisado de ADN de *Salmonella* Oranienburg cepa S-76), dos controles negativos (lisado de la cepa *Citrobacter* y *E. coli*) y un control blanco (mezcla sin ADN molde).

5.4 Secuenciación de Genomas

5.4.1 Preparación de la Biblioteca Genómica y Secuenciación de Lectura Larga

Para la secuenciación del genoma completo, los aislados de *Salmonella* se cultivaron durante 24 h en TSB a 37 °C en condiciones aeróbicas y la extracción del material genético se realizó con el kit de extracción Dneasy blood and tissue (QIAGEN, Ciudad de México, México) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad del ADN genómico extraído de las cepas de *S. enterica* se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 y un fluorómetro Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, MA EE. UU.). La secuenciación del genoma de lectura larga se realizó utilizando un dispositivo MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido). Las bibliotecas de secuenciación se prepararon utilizando un total de 400 ng de ADN por cada cepa de *Salmonella* utilizando el kit de secuenciación de códigos de barras rápida SQK-RBK-004 (Oxford Nanopore Technologies), siguiendo las recomendaciones y procedimientos del flujo de trabajo del fabricante. Las bibliotecas preparadas se secuenciaron posteriormente en celdas de flujo FLO-MIN106 (R9.4.1, número de poro activo ≥ 1100) (Oxford Nanopore Technologies) durante un total de 48 horas.

5.4.2 Procesamiento y Ensamble del Genoma

Las lecturas de secuenciación sin procesar se recortaron y demultiplexaron con el software Guppy versión 3.4.4, utilizando el archivo de configuración del modo de alta precisión titulado "dna_r9.4.1_450bps_hac.cfg", que se instaló en una estación de trabajo de escritorio de alto rendimiento (Dell Precision 3630, Dell Technologies, Round Rock, TX, EE. UU.) con un sistema operativo Linux Ubuntu versión 18.04.6. La estación de trabajo contenía una tarjeta gráfica NVIDIA RTX4000 con un total de 2304 núcleos Compute Unified Device Architecture (CUDA) y 64 GB de memoria de acceso aleatorio (Dell Technologies) para generar datos de secuencia casi en tiempo real, lo que permite análisis más rápidos. Posteriormente, se realizó el control de calidad y ensamblaje de las lecturas de secuenciación con el software Canu versión 2.1.1, utilizando las opciones preestablecidas recomendadas para lecturas de secuenciación obtenidas con la plataforma Oxford Nanopore Technologies.

5.4.3 Serotipificación *in silico*

Para realizar la genoserotipificación de los aislados de *Salmonella*, se utilizó una herramienta bioinformática SeqSero que es utilizada para determinar los serotipos de *Salmonella* empleando datos de secuenciación del genoma de alto rendimiento, los contigs resultantes de la secuenciación se enviaron al sitio web de SeqSero, el cual es una herramienta de software para la determinación del serotipo de *Salmonella* a partir de datos de secuenciación del genoma completo (WGS) (Zhang *et al.*, 2019).

5.4.4 Anotación y Visualización del Genoma

Una vez ensambladas las secuencias, estas fueron depositadas en la base de datos PATRICBRC (Pathosystems Resource Integration Center, Bioinformatics Resource Center) para su anotación,

(Davis *et al.*, 2015), donde se realizó la anotación utilizando las bases de datos RASTtk, Genbank, ARDB, CARD, NDARO, VFDB, Victors, Drugbank, TTD y PATRIC AMR genes; se optó por esta plataforma ya que permite comparar y visualizar de manera interactiva y gráfica los genomas obtenidos (Davis *et al.*, 2020).

5.4.5 Identificación y Anotación de Genes de Resistencia

Los genes de resistencia a antibióticos de los aislados de *Salmonella* fueron analizados y anotados utilizando la base de datos CARD (Comprehensive Annotation Resistance Database) que es un servidor en línea (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) usando la herramienta bioinformática proporcionada por la misma base de datos, RGI (Resistance Gene Identifier) y utilizando los valores predeterminados de la herramienta para el análisis de los genes de resistencia (McArthur *et al.*, 2013).

5.4.6 Identificación y Anotación de Factores de Virulencia

Los factores de virulencia fueron analizados y anotados utilizando la base de datos VFDB (virulence factor database) es el servidor en línea para el análisis de los factores de virulencia relacionado con el genoma bacteriano (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Este servidor permite la identificación de factores de virulencia con características estructurales, mecanismos y funciones (Gunasekara *et al.*, 2022).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de *Salmonella* spp. en Heces de Animales

El aislamiento de cepas de *Salmonella* en heces de gallinas, vaca y cerdo se realizó considerando como puntos de toma de muestra a La Laguna (A), San Pedro 1 (E), San Pedro 2 (D), Punto F (F), La Curva (B) y Las Ilusiones (C). El total de muestras recolectadas fueron 77 (36 de heces vaca, 14 heces de gallina y 27 heces de cerdo) durante el periodo de diciembre 2020 a febrero 2021. Los resultados de este estudio muestran la presencia presuntiva de *Salmonella* spp. en el 53.2% (41/77) de las muestras analizadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de muestras presuntivas para *Salmonella* aisladas de heces de animales.

Lugar de toma de muestra	Fuente Heces	Muestras presuntivas/número de muestras	Aislados
La laguna	Vaca	2/6	9
La curva	Vaca	2/6	5
	Cerdo	5/6	15
	Gallina	3/3	13
Las Ilusiones	Vaca	2/6	5
	Cerdo	4/5	9
	Gallina	3/5	21
San Pedro 2	Cerdo	4/6	25
	Vaca	2/6	11
San Pedro 1	Vaca	2/6	2
	Cerdo	6/6	23
	Gallina	4/6	13
Punto F	Cerdo	2/4	3
	Vaca	0/6	ND
Total		41/77	154

*No detectado

6.2 Confirmación de Cepas de *Salmonella*

La confirmación molecular de *Salmonella* se llevó a cabo amplificando el gen *invA* por PCR punto final para los 154 aislados, previamente almacenados a -20 °C, provenientes de las muestras analizadas de las cuales 32 provienen de heces de vaca, 47 de heces de gallina y 75 heces de cerdo. Del total de aislados presuntivos, el 44.15% (68/154) resultó positivo para el género *Salmonella* (Cuadro 3), de las cuales 30.88% (21/68), 38.23% (26/68), 30.88% (21/68) fueron de vaca, cerdo y gallina, respectivamente.

Cuadro 3. Lista de aislados positivos para *Salmonella*.

Muestra	Fecha de muestreo	Fuente	Región	BPW	TSB	Gene <i>InvA</i>
Bc01	03-Dic-20	Cerdo	La curva	2		+
Cc01	03-Dic-20	Cerdo	Las ilusiones	1		+
Dc01	03-Dic-20	Cerdo	San Pedro 2		2	+
Ev01	03-Dic-20	Vaca	San pedro 1	2		+
Ec01	03-Dic-20	Cerdo	San pedro 1	1	1	+
Eg01	03-Dic-20	Gallina	San pedro 1	2		+
Bc02	18-Dic-20	Cerdo	La curva	1		+
Bg02	18-Dic-20	Gallina	La curva		1	+
Cc02	18-Dic-20	Cerdo	Las ilusiones		1	+
Dv02	18-Dic-20	Vaca	San pedro 2	9		+
Dc02	18-Dic-20	Cerdo	San pedro 2	5		+
Ec02	18-Dic-20	Cerdo	San pedro 1		1	+
Av03	10-Ene-21	Vaca	La laguna	5		+
Bv03	10-Ene-21	Vaca	La curva	2		+
Cg03	10-Ene-21	Gallina	Las ilusiones	3	1	+
Dc03	10-Ene-21	Cerdo	San pedro 2	1		+
Ec03	10-Ene-21	Cerdo	San pedro 1	1		+
Eg03	10-Ene-21	Gallina	San pedro 1	1		+
Bv04	27-Ene-21	Vaca	La curva	1		+
Bg04	27-Ene-21	Cerdo	La curva	5		+
Cg04	27-Ene-21	Gallina	Las ilusiones	8	2	+

Dc04	27-Ene-21	Cerdo	San Pedro 2	4		+
Ec04	27-Ene-21	Cerdo	San pedro 1	2		+
Fc05	11-Feb-21	Cerdo	Punto F		1	+
Ev06	25-Feb-21	Vaca	San pedro 1		1	+
Ec06	25-Feb-21	Cerdo	San pedro 1	1		+

*BPW: agua de peptona tamponada, TSB: caldo soya tripticaseína.

Las cepas en estudio fueron aisladas por dos diferentes caldos de enriquecimiento de las muestras, debido a que los medios de enriquecimiento están diseñados para favorecer a un organismo objetivo y es posible que las condiciones no favorezcan por igual a todas las cepas o serovariedades (Gorski *et al.*, 2011). En este estudio, consistió en la utilización de BPW y de manera simultánea TSB como caldo de pre-enriquecimiento. Los resultados muestran que del total de cepas positivas para *Salmonella* el 83.82% (57/68) provienen de la utilización del caldo de pre-enriquecimiento BPW y el 16.17% (11/68) de cepas positivas provienen de la utilización del caldo de pre-enriquecimiento TSB.

Por otro lado, la utilización los medios de cultivo BPW-XLD en muestras de heces lograron detectar el mayor número de muestras positivas (30 de 68), seguido de BPW-EH con 20 de 68; y por último TSB-XLD con 18 de 68 (Figura 2). Sin embargo, en cuanto a la detección de serovariedades utilizando el protocolo TSB-XLD se identificaron 3 diferentes serovariedades y para BPW-XLD solo se identificaron 2 serovariedades.

Estos resultados enfatizan la importancia de usar múltiples métodos de enriquecimiento para aumentar la probabilidad de aislar cepas de *Salmonella* que podrían tener diferentes características de aptitud de cultivo en las muestras de heces con diversa microbiota nativa que podría sesgar la aptitud del organismo en estudio.

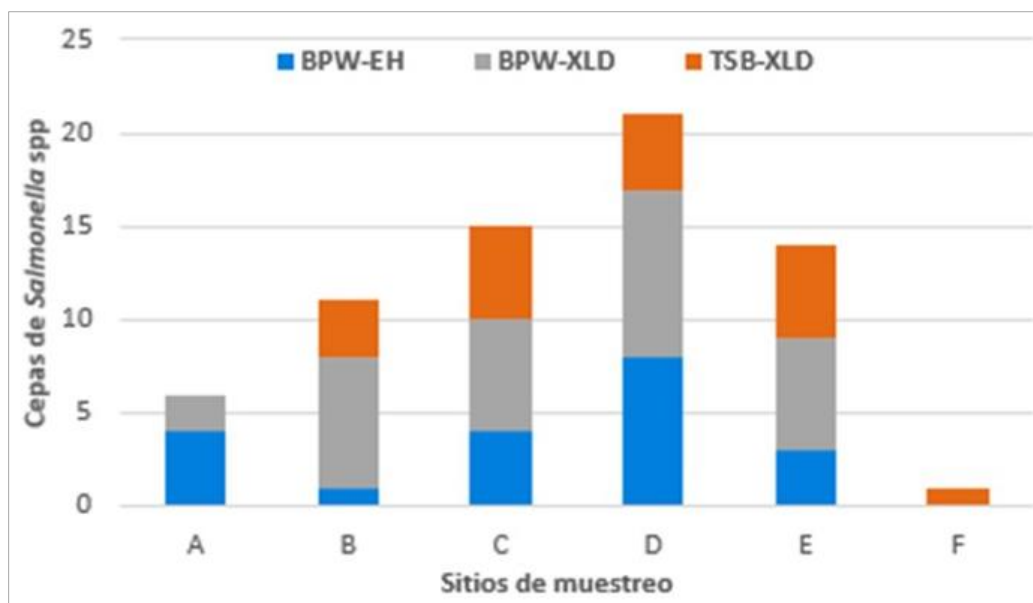


Figura 2. Cepas de *Salmonella* spp. aisladas por método de aislamiento.

Los resultados de este estudio mostraron la presencia de *Salmonella* spp. con una prevalencia del 32.4% (25/77) de las muestras analizadas (Cuadro 4). Esto es importante, considerando la naturaleza de nuestro estudio, que consiste en un muestreo transversal; es decir, se deben tomar varias submuestras para reducir el efecto de la diseminación intermitente (Chousalkar *et al.*, 2016).

Esto coincide notablemente con trabajos publicados anteriormente en los que se investiga la presencia de *Salmonella* en heces de animales y su prevalencia está reportada en valores del 30% aproximadamente (Jimenez *et al.*, 2011; Raufu *et al.*, 2021). En nuestra investigación resultaron positivas 25 muestras para *Salmonella* spp. (33.7%). De estas, las heces de cerdo mostraron la mayor incidencia con el 55.5% (15/27), seguidas de las gallinas y vacas con el 35.7% (5/14) y el 16.6% (6/36), respectivamente. El aislamiento de *Salmonella* spp. en los diferentes sitios de muestreo tuvo la siguiente distribución de muestras positivas. El sitio San Pedro 1 (E) obtuvo el 60% (9/18) de muestras positivas. El sitio La curva (B) tuvieron el 40% (6/15) de muestras positivas. El sitio San Pedro 2 (D) tuvieron 41.6% de muestras positivas y seguidos de los sitios Las ilusiones (C) y La laguna (A) con 25% (4/16) y 16% (1/6) respectivamente.

Los animales criados en pequeña escala pueden desempeñar un papel importante en la distribución y diseminación de *Salmonella* spp. debido al movimiento de animales, las malas medidas de

bioseguridad y la mezcla de animales de diferentes especies y edades (Behravesch *et al.*, 2014; Brioudes y Gummow, 2017). Los animales incluidos en el estudio se encuentran muy cerca de cuerpos de agua como ríos y canales de riego, además de encontrarse cercanas a las áreas agrícolas de producción de alimentos con implicaciones potenciales para la transmisión de *Salmonella* spp. y riesgo de brotes de salmonelosis en humanos.

Cuadro 4. Confirmación de *Salmonella* en muestras de heces mediante PCR punto final.

Fuente	Número de muestras positivas para <i>Salmonella</i> por sitio de muestreo						Total
	A	B	C	D	E	F	
Vaca	1	2	**	1	2	ND*	6
Cerdo	ND *	3	2	4	5	ND*	15
Gallina	ND *	1	2	**	2	ND*	5
Total	1	6	4	5	9	ND*	26

* ND, No determinado por ausencia de *Salmonella*

Los resultados de esta investigación muestran la presencia de serovariedades de *Salmonella* en los animales evaluados. El contacto prolongado y directo con animales infectados podría desencadenar la dispersión en el ambiente y ocasionar brotes de infección en humanos (Adeniyi *et al.*, 2011; Syed *et al.*, 2013).

La incidencia de *Salmonella* en cerdos puede ser comparada con lo realizado en Tailandia por Phongaran y colaboradores (2019), donde obtuvieron una prevalencia del 37.54% (211/562) del patógeno. En nuestro estudio las heces de gallina ocupan el segundo lugar de prevalencia de *Salmonella* (42.8%), coincidiendo con otros estudios en los que las muestras positivas oscilaron entre el 33% y el 72% (Berrang *et al.*, 2009; Jiménez *et al.*, 2011). Las aves de corral se consideran importantes reservorios de *Salmonella* spp. Ya que la mayoría de los serotipos no adaptados a hospedadores específicos se han recuperado de animales sanos, lo cual se considera como el principal factor de riesgo, ya que las bacterias se podrán transmitir fácilmente en los huevos de mesa y la carne de aves de corral a los seres humanos (Gyles , 2008; Hugas y Beloeil, 2014).

Además, podemos asumir que existen otros factores ambientales que influyen en la diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo con lo reportado en la literatura, como es el tamaño

de muestra, las diferencias en la región, el tipo de muestra, las condiciones ambientales y el período del muestreo. Por lo que se recomienda aumentar el número de muestras y extender el período de muestreo para tener mayor probabilidad de aislar diferentes serotipos de *Salmonella* de heces.

6.3 Secuenciación, Ensamble y Anotación De Genomas

Para la secuenciación del genoma completo se seleccionaron 9 cepas de *Salmonella* provenientes de heces de cerdos distribuidos en cuatro sitios de muestreo. Los datos del ensamblaje y contenido genético se muestran en el cuadro 5, los genomas ensamblados para las cepas examinadas tienen una cobertura aproximada de 40,4X a 45,07X. El tamaño del genoma varía entre serovares con un rango desde 4,941,109 a 5,583,603 pb, además se puede observar que todos presentan un porcentaje de Guanina-Citosina (G+C) de aproximadamente 52%, lo que concuerda con los genomas reportados por múltiples análisis (Kim *et al.*, 2017; Raufu *et al.*, 2017).

Cuadro 5. Estructura Genómica de cepas de *S. enterica* aisladas de cerdo.

Cepa	Contenido GC	Tamaño del genoma
H3	52.21	5,065,664 pb
H4	52.17	5,138,398 pb
H25	52.03	5,272,410 pb
H26	52.20	5,034,880 pb
H31	51.91	5,583,603 pb
H36	46.59	5,025,055 pb
H39	51.98	5,226,121 pb
H44	52.19	4,941,109 pb
H49	52.05	5,073,586 pb

6.4 Diversidad de Serotipos de *Salmonella* Aislados

Los genomas de las cepas seleccionadas de *Salmonella* fueron secuenciados y ensamblados de

novo, y posteriormente sometidos a una serie de análisis *in silico* con el propósito de identificar el serotipo de las distintas cepas de *Salmonella*. Para ello, se procedió a realizar la serotipificación *in silico* mediante el uso del sitio web “SeqSero” y mediante el programa “*Salmonella In Silico Typing Resource*” (SISTR). Este último integra la tipificación por métodos de análisis de tipificación multilocus de secuencias (MLST), MLST ribosomal (rMLST) y genoma core MLST (cMLST) (Yoshida *et al.*, 2016; Uelze *et al.*, 2020) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Serotipificación *in silico* de las cepas de *Salmonella* secuenciadas.

Cepa	Sitio	Fuente	Serotipo predicho en SeqSero	Serotipo predicho en SISTR	ST SISTR
H3	Las ilusiones	Cerdo	Typhimurium	Typhimurium	19
H4	La curva	Cerdo	Weltevreden	Weltevreden	365
H25	San pedro 2	Cerdo	Weltevreden	Weltevreden	365
H26	San pedro 2	Cerdo	Typhimurium	Typhimurium	19
H31	San pedro 2	Cerdo	Weltevreden	Weltevreden	365
H36	San pedro 1	Cerdo	Weltevreden	Weltevreden	365
H39	San pedro 1	Cerdo	Weltevreden	Weltevreden	365
H44	San pedro 1	Cerdo	Havana	Havana	588
H49	San Pedro 2	Cerdo	Sandiego	Sandiego	126

La indentificación de serotipos *in silico* corresponden a Weltevreden (5 cepas), Typhimurium (2 cepas), Sandiego (1 cepa), y Havana (1 cepa). El serotipo más prevalente en este estudio fue *S. Weltevreden*, serotipo que se ha reportado como uno de los más comunes en muestras porcinas (Phongaran *et al.*, 2019).

En este estudio se aisló *S. Typhimurium*, el cual es una serovariedad móvil y altamente invasiva, que se ha adaptado para sobrevivir fuera de un hospedero animal y es uno de los patógenos más comunes en las infecciones humanas transmitidas por alimentos en todo el mundo (Li *et al.*, 2017). Este serotipo se asocia con la producción porcina y la contaminación de las canales (Pesciaroli *et al.*, 2017). En México, *S. Typhimurium* fue identificado como uno de los serotipos más predominantes en el ambiente entre 1968 a 2018. El tercer serotipo identificado en este estudio fue *S. Havana*, un serotipo que se encuentra menos asociado con la cadena de producción de carne

de cerdo, con pocos informes de su aislamiento en cerdos (Castagna *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2016). Este serotipo se encuentra relacionado con brotes por consumo de alfalfa (Harfield *et al.*, 2019). El cuarto serotipo identificado en este estudio fue *S. Sandiego*, un serotipo que se ha aislado de animales de granja. El serotipo Sandiego estuvo relacionado con un brote de salmonelosis multiestatal en Estados Unidos, vinculado con el consumo de ensalada de pasta “Spring Pasta Salad” comercializada en las tiendas de alimentos Hy-Vee (CDC, 2018).

Durante este proyecto se llevó a cabo el análisis específico de los genomas por biología computacional de las 9 cepas aisladas de cerdos. En el cuadro 6 se presentan los tipos de secuencia, también denominados como “sequence typing” (ST) asignados a cada cepa. Para todos los serotipos se obtuvo un único ST. De acuerdo con lo establecido por Urwin y Maiden (2003), los aislados que presentan un mismo ST se encuentran estrechamente relacionadas.

La identificación de los ST entre los 9 genomas secuenciados fueron 4. El ST más frecuente fue el ST365 (5/9). Además, se asignaron los ST126 (1/9), ST19 (2/9), ST588 (1/9). Por ejemplo, ST19 pertenece a las cepas secuenciadas y bien caracterizadas de *S. Typhimurium* LT2, SL1344 y NCTC13348 y estas cepas han sido asociadas con síntomas clásicos de gastroenteritis. El genotipo ST19 es el tipo de secuencia (sequence type) más común en *S. Typhimurium* aislada en diversas localizaciones en todo el mundo.

Con respecto a *Salmonella* Weltevreden, se han reportado brotes en diferentes partes del mundo ocasionados por este patógeno, como son Europa, India, Norte América (D'ortenzio *et al.*, 2008; Saikia *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2015). En un estudio realizado por Zhang y colaboradores (2021), reportaron la prevalencia de *S. Weltevreden* ST365, de 178 genomas disponibles en la base de datos pública del NCBI en 2020. De estos genomas, 170 pertenecieron al genotipo ST365, siendo el ST más común de *Salmonella* Weltevreden a nivel mundial. Además, el análisis filogenético reveló que presentaban una relación filogenética muy cercana a los aislados de otras partes del mundo. A su vez, en la base de datos “EnteroBase” el ST ST365 se agrupa en el complejo clonal 205 con los STs, 2183, 2383, 3771, 3902, lo cual indica una relación entre las clonas ST365 y la presencia de diarrea en humanos.

Salmonella Sandiego, es una serovariedad que por lo general no se asocia con brotes de gastroenteritis relacionados al consumo de alimentos contaminados en Estados Unidos (CDC, 2018). Con respecto a la prevalencia de *S. Sandiego*, el ST ST126 en la base de datos de EnteroBase se encuentran 262 genomas pertenecientes a esta serovariedad; de los cuales, 168 pertenecen al ST 126, lo que lo vuelve el ST de *S. Sandiego* con mayor prevalencia. Al mismo tiempo, todos los ST126 pertenecen al complejo clonal 12, lo que indica muy poca divergencia evolutiva de este patógeno.

Los resultados obtenidos en este estudio nos indican un solo ST representativo para cada uno de los serotipos (no se encuentra un mismo ST representado a más de un serotipo), lo que indica una relación cercana entre estas características, información que concuerda con lo descrito por Liu y colaboradores (2011). Asimismo, el poder de resolución otorgado por la secuenciación de genomas completos para la serotipificación *in silico* de *Salmonella* puede superar las limitaciones de la serotipificación tradicional, dando lugar a una identificación confiable de los serotipos para este género taxonómico (Achtman *et al.*, 2012).

6.5 Visualización de los Genomas Aislados de *Salmonella*

6.5.1 Anotación del Genoma de *Salmonella enterica* Serotipo Typhimurium

Los resultados de la anotación genómica de las cepas de *Salmonella* Typhimurium mostraron que los genomas presentaron un tamaño de entre 5,034,880 y 5,065,664 pb, los cuales contenían entre 5,801 y 5,863 de secuencias codificantes, ARNs entre 87 y 93, contenido de GC entre 52.20 y 52.21%.

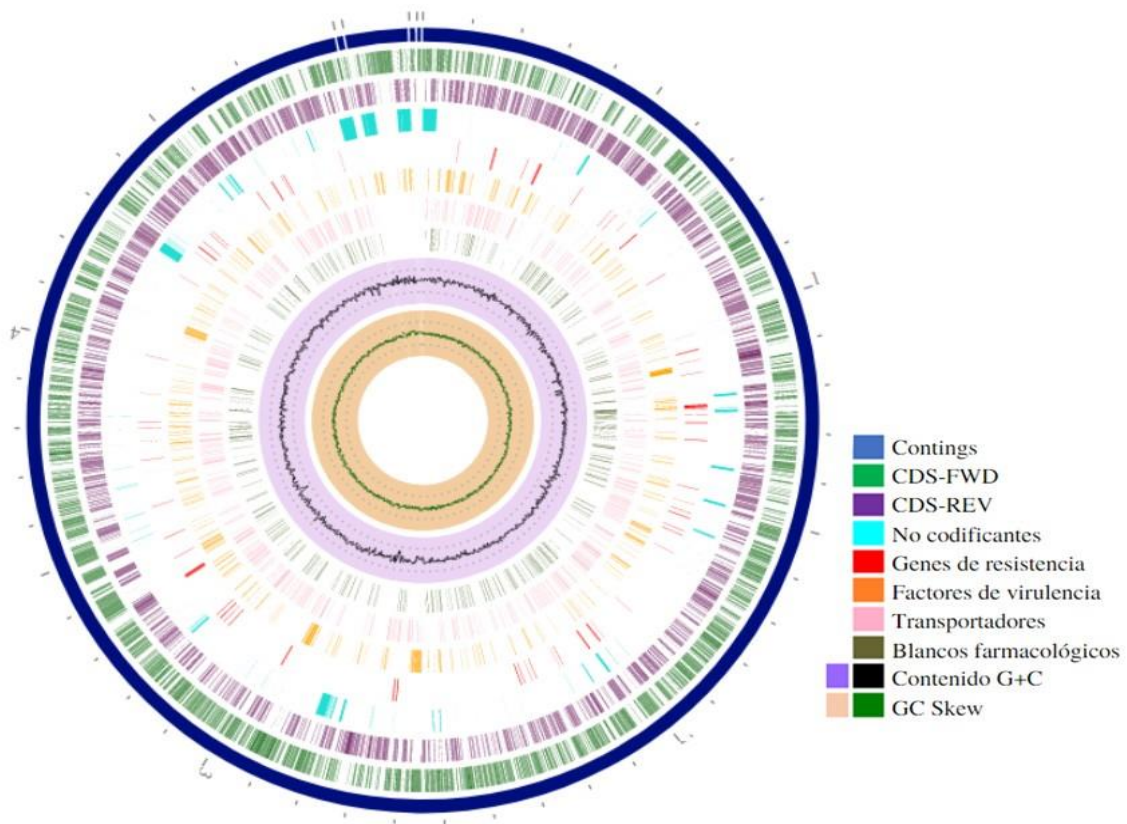


Figura 3. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (Cepa H3) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigs el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

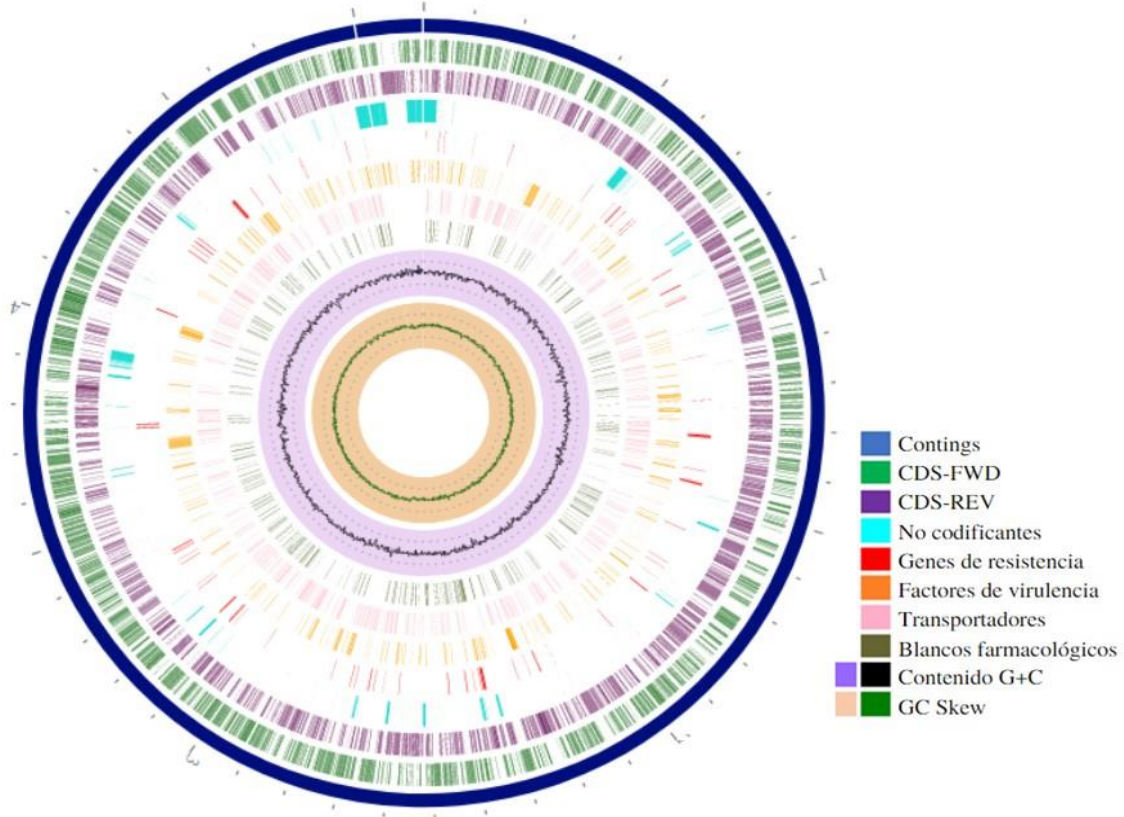


Figura 4. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium (cepa H26) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

En cuanto a factores de virulencia, los genomas de las cepas de *S. Typhimurium* pueden contener entre 167 y 409 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presentan pueden ir de 79 a solamente 1 gene (cuadro 7).

Cuadro 7. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de *Salmonella* Typhimurium.

	Fuente	Genes	
		Cepa H3	Cepa H26
Factor de virulencia	Victors	409	408
Factor de virulencia	PATRIC_VF	407	408
Factor de virulencia	VFDB	170	167

Transportadores	TCDB	799	802
Blancos farmacológicos	DrugBank	384	390
Blancos farmacológicos	TTD	59	58
Resistencia a antibióticos	PATRIC	71	71
Resistencia a antibióticos	CARD	79	79
Resistencia a antibióticos	NDARO	1	1

6.5.2 Anotación de *Salmonella enterica* Weltevreden

Los resultados de la anotación genómica de las cepas de *Salmonella* Weltevreden mostraron que los genomas presentaron un tamaño de entre 5,025,055 y 5,583,603 pb, los cuales contenían entre 6,003 y 10,714 secuencias codificantes, los ARNs entre 84 y 157, contenido de G+C entre 46.59 y 52.17.

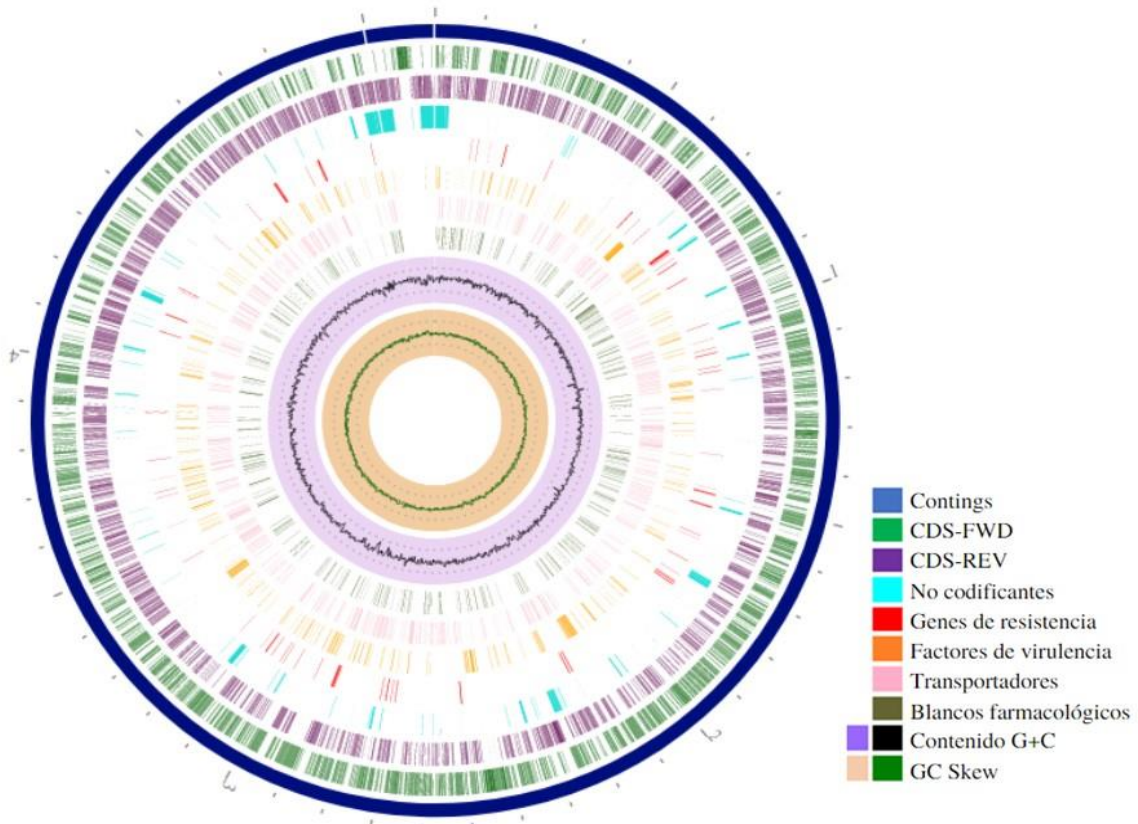


Figura 5. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Weltevreden (cepa H4) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

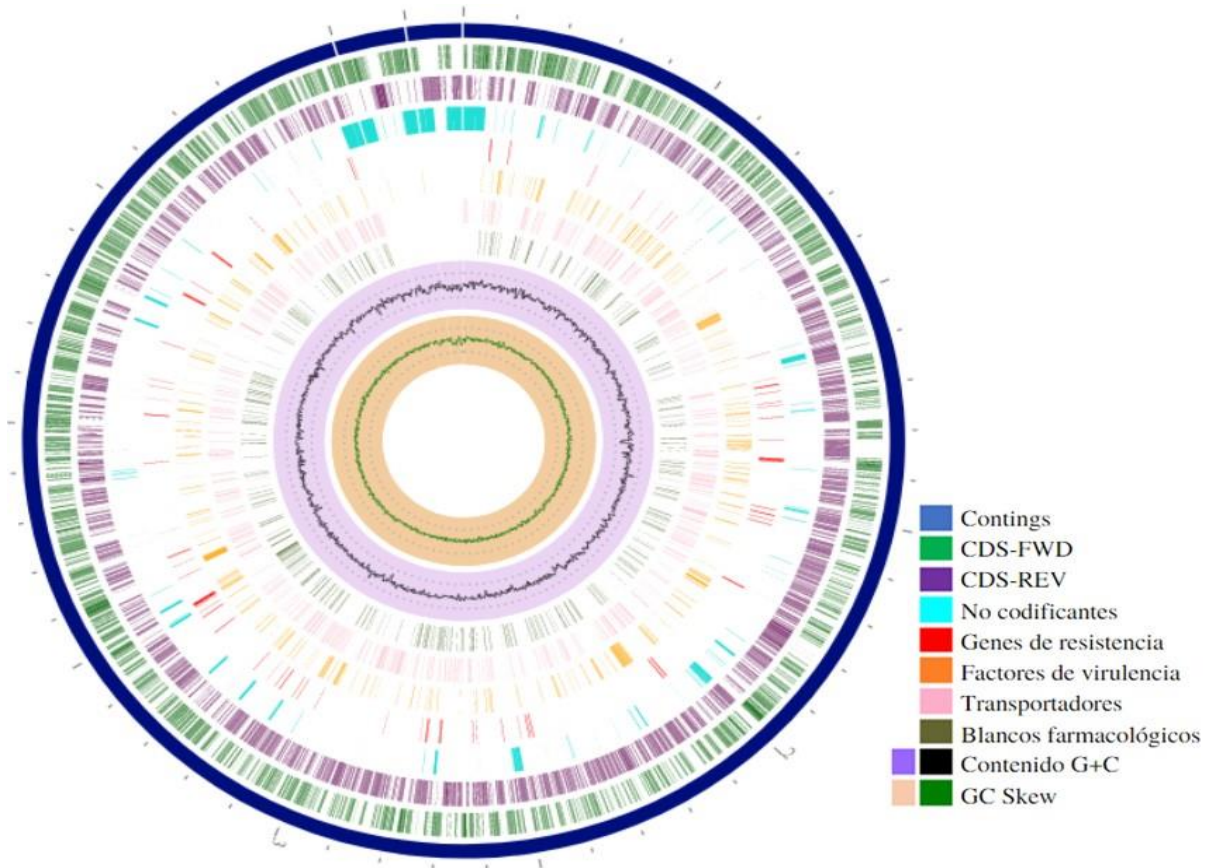


Figura 6. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Weltevreden (Cepa H25) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

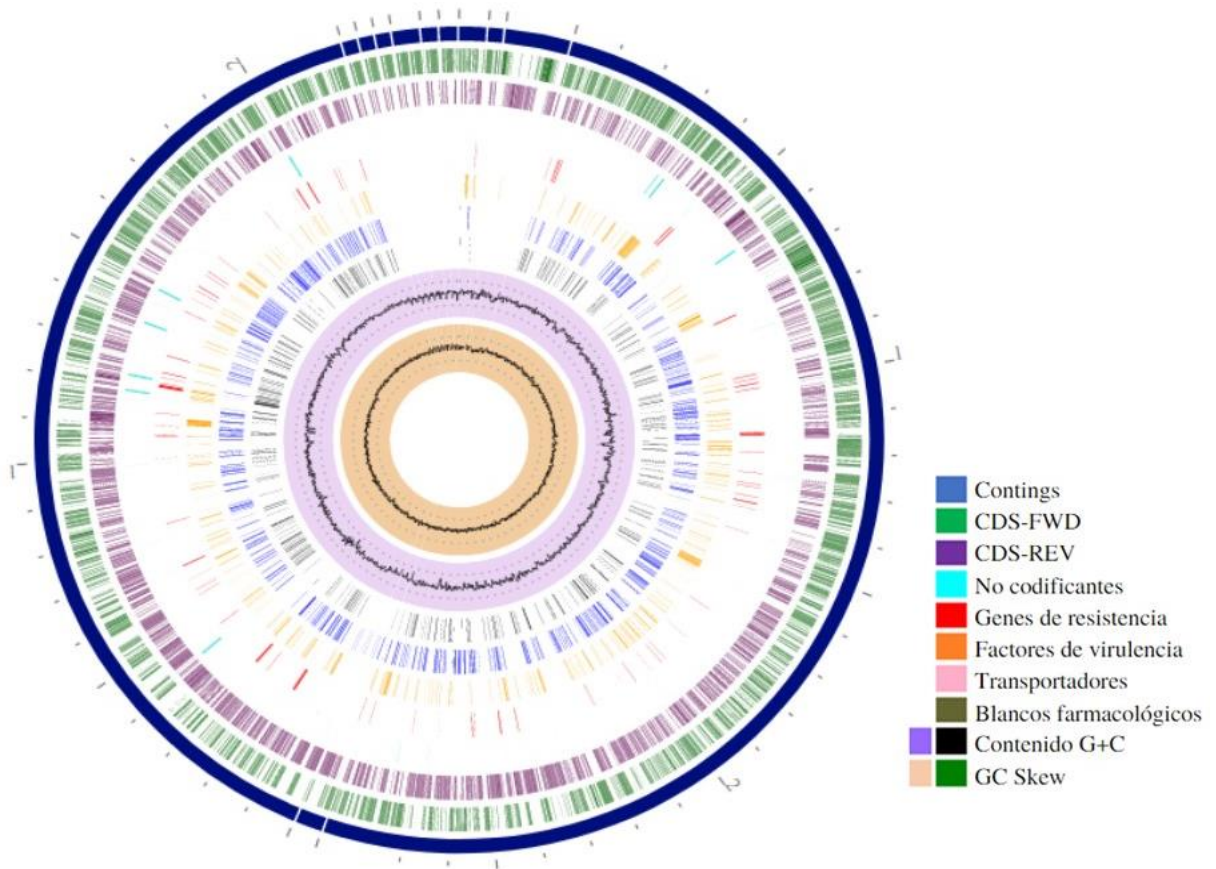


Figura 7. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Weltevreden (Cepa H31) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

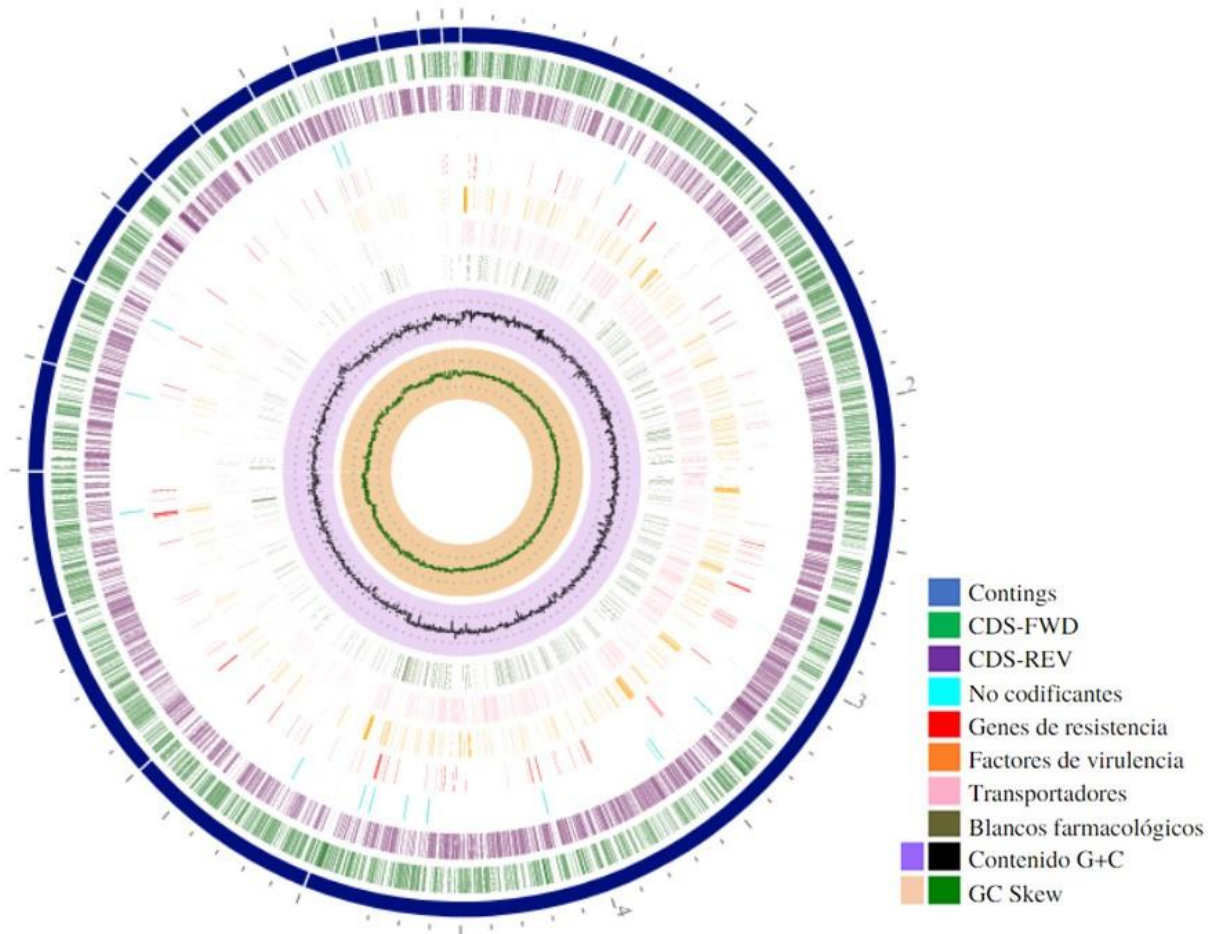


Figura 8. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Weltevreden (Cepa H36) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

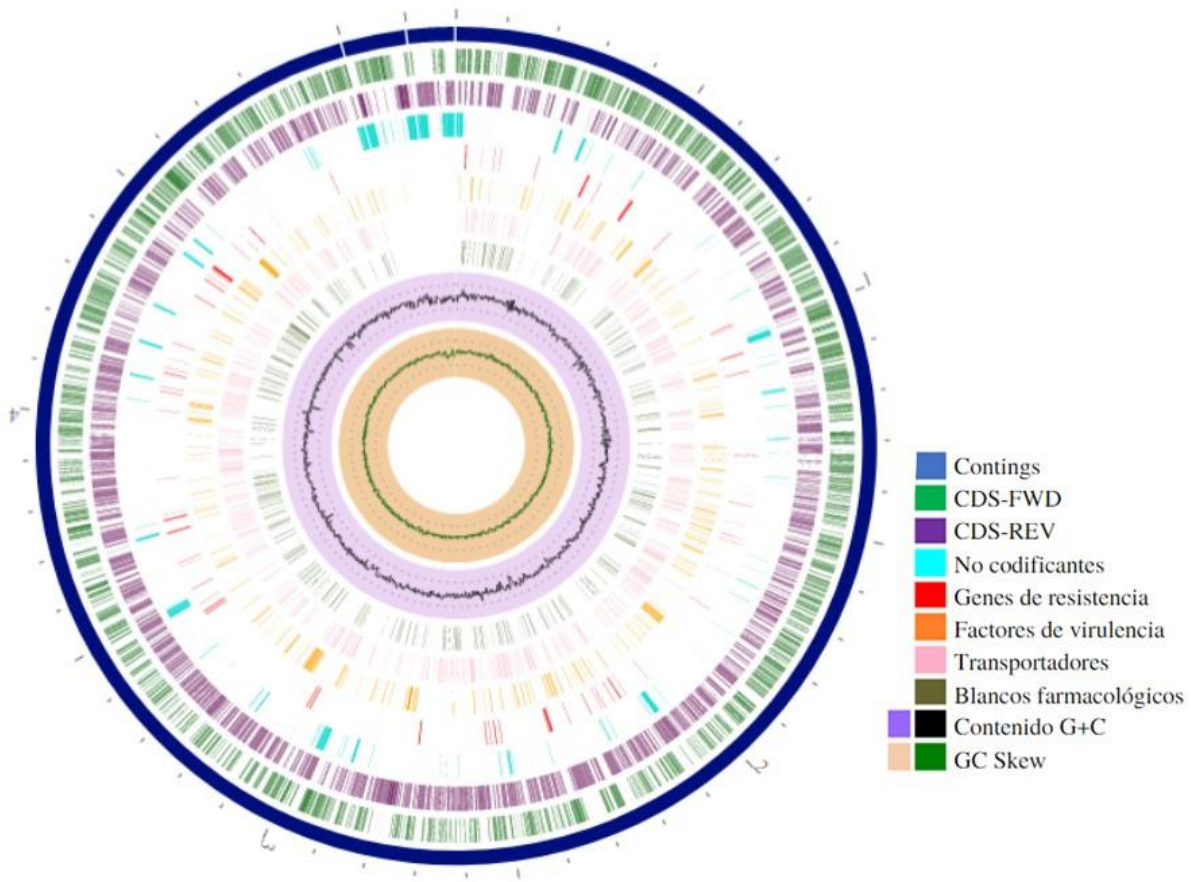


Figura 9. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Weltevreden (Cepa H39) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

En cuanto a factores de virulencia, los genomas de las cepas de *S. Weltevreden* pueden contener entre 136 y 451 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presentan pueden ir de 125 a solamente 1 gene (cuadro 8).

Cuadro 8. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de *S. Weltevreden*.

	Fuente	Genes				
		Cepa H4	Cepa H25	Cepa H31	Cepa H36	Cepa H39
Factor de virulencia	Victors	379	372	380	451	365
Factor de virulencia	PATRIC_VF	373	365	387	419	361
Factor de virulencia	VFDB	142	140	144	144	136
Transportadores	TCDB	814	818	827	951	803
Blancos farmacológicos	DrugBank	390	382	390	505	385
Blancos farmacológicos	TTD	61	59	60	78	59
Resistencia a antibióticos	PATRIC	74	71	73	125	71
Resistencia a antibióticos	CARD	83	78	86	98	83
Resistencia a antibióticos	NDARO	1	1	1	4	1

6.5.3 Anotación de *Salmonella enterica* Serovariedad Havana

Los resultados de la anotación genómica de la cepa de *Salmonella* Sandiego mostraron que el genoma presentó un tamaño de 4,941,109 pb, el cual contenía 6,003 secuencias codificantes, 84 ARNs y el contenido de G+C de 52.19.

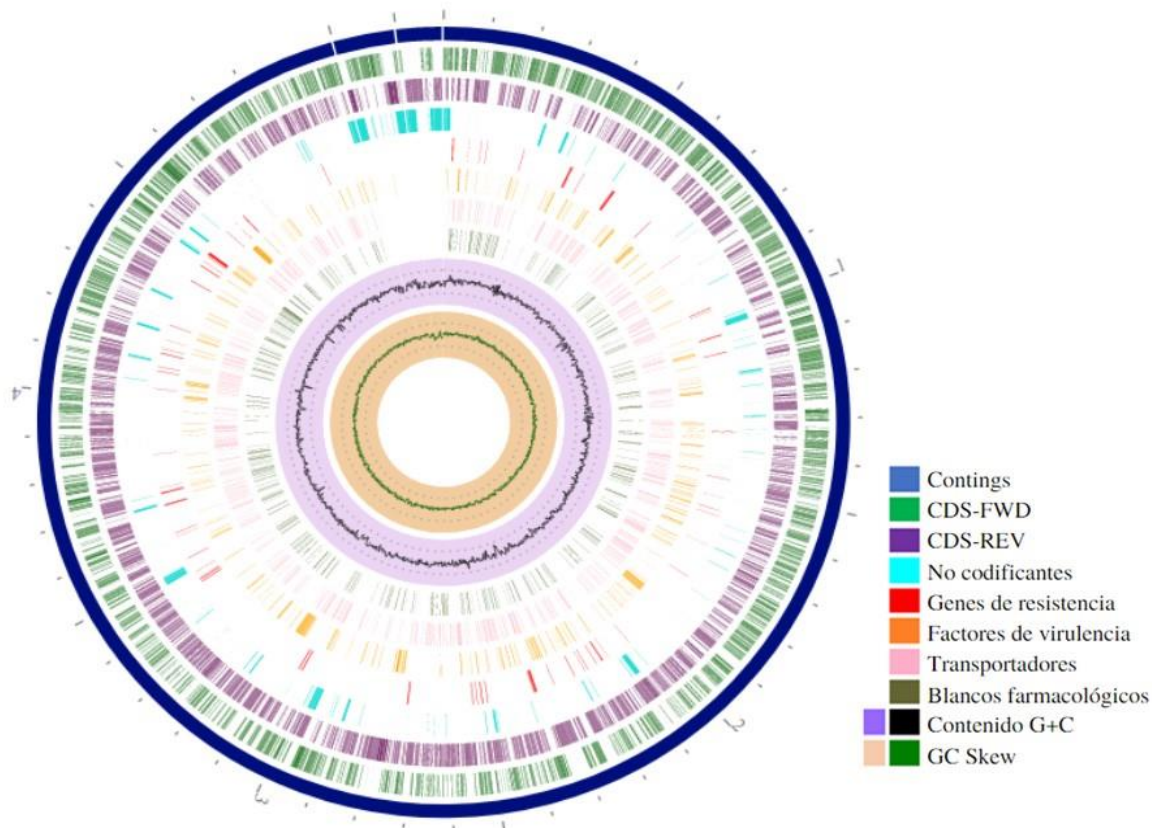


Figura 10. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad Havana (Cepa H44) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

En cuanto a factores de virulencia, los genomas de las cepas de *S. Havana* pueden contener entre 154-362 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presentan pueden ir de 85 a solamente 1 gene (cuadro 9).

Cuadro 9. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos de *Salmonella* Havana

<i>Salmonella</i> Havana (H44)	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	362
Factor de virulencia	PATRIC_VF	359
Factor de virulencia	VFDB	154
Transportadores	TCDB	831

Blancos farmacológicos	DrugBank	394
Blancos farmacológicos	TTD	58
Resistencia a antibióticos	PATRIC	75
Resistencia a antibióticos	CARD	85
Resistencia a antibióticos	NDARO	1

6.5.4 Anotación de *Salmonella enterica* Serovariedad San Diego

Los resultados de la anotación genómica de la cepa de *Salmonella* San Diego mostraron que el genoma presentaba un tamaño de 5,073,586 pb, el cual contenía 6,003 secuencias codificantes, 84 ARNs y el contenido de G+C de 52.05.

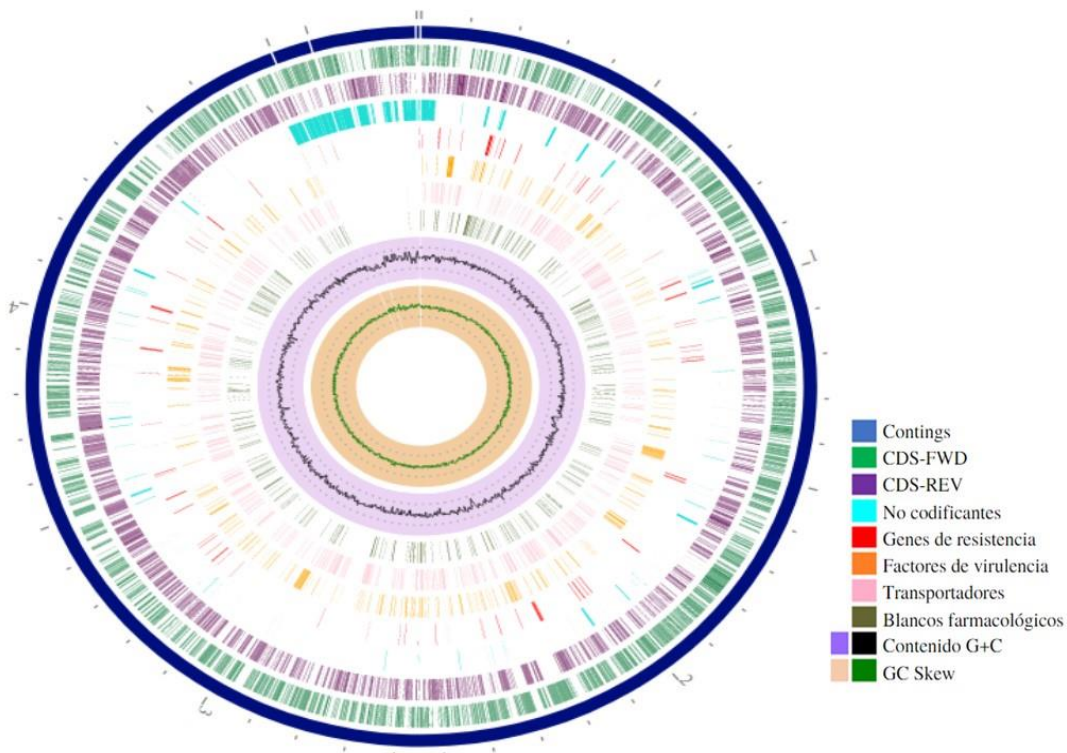


Figura 11. Genoma anotado de *Salmonella enterica* serovariedad San Diego (Cepa H49) con el servidor PATRICBRC. Del lado derecho se señala cada anillo de la figura circular del genoma, siendo el número de cóntigos el anillo azul exterior y los diferentes grupos de genes de especialidad como el anillo color rojo indica genes de resistencia a antibióticos, el anillo color verde factores de virulencia, anillo color rosa transportadores y anillo color gris blancos farmacológicos.

En cuanto a factores de virulencia, los genomas de las cepas de *S. Sandiego* pueden contener entre 133-357 genes, dependiendo de la base de datos consultada; de la misma manera, los genes asociados a resistencia a antibióticos que presentan pueden ir de 84 a solamente 3 genes (cuadro 10).

Cuadro 10. Factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos *Salmonella* Sandiego

<i>Salmonella</i> Sandiego (Cepa H49)	Fuente	Genes
Factor de virulencia	Victors	357
Factor de virulencia	PATRIC_VF	352
Factor de virulencia	VFDB	133
Transportadores	TCDB	827
Blancos farmacológicos	DrugBank	393
Blancos farmacológicos	TTD	60
Resistencia a antibióticos	PATRIC	79
Resistencia a antibióticos	CARD	84
Resistencia a antibióticos	NDARO	3

6.6 Identificación *in silico* de Genes de Resistencia a Antibióticos

La presencia de genes de resistencia a antibióticos para los 9 genomas de *Salmonella* se detectó utilizando la base de datos CARD. Se encontraron 34 genes de resistencia a los antibióticos en los 9 genomas (Fig. 16). Todos los genomas portaban al menos un gen de resistencia a los antibióticos. Además, siete de los genomas contenían el gen *aac(6′)-Iaa* asociado con la resistencia a los aminoglucósidos (Mansour *et al.*, 2020; Ramirez-Hernandez *et al.*, 2021). El gen *aac(6′)-Iaa* es responsable de la resistencia a amikacina, kanamicina o tobramicina. Por otro lado, el gen de resistencia a aminoglucósidos *AAC(6′)-Iy* solo se encuentran presentes en los genomas de *S. Havana* y *S. Sandiego*.

Se identificaron los genes implicados en sistemas de eflujo específicos, incluyendo genes asociados con el sistema *acrAB*, *marA*, *soxR* y *soxS* (Srinivasan *et al.*, 2012). Curiosamente, aunque se detectó el gen *acrA* en todas las cepas, no se detectó *acrB* en ningún aislado. Finalmente, se encontraron transportadores *msbA*. En todos los aislados se presentó el gen *kdpE* que es un regulador del transporte de potasio asociado con la resistencia a los aminoglucósidos (Hirakawa *et al.*, 2003).

La resistencia antibiótica es un problema que existe desde la aparición de los antibióticos y en la actualidad se ha incrementado gradualmente debido a su uso de manera indiscriminada. Esto ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos haciéndolos desarrollar formas para interrumpir los mecanismos de acción de estos fármacos, activando genes que expresan mecanismos que inhiban la acción de los antibióticos, convirtiéndose así en un problema de salud pública (OMS, 2018).

El desarrollo de esta característica en microorganismos susceptibles y expuestos a antimicrobianos es inevitable ya que representa un aspecto natural de la evolución bacteriana. No obstante, este proceso se ha acelerado y expandido globalmente por la presión ejercida por exposición a contaminantes ambientales, uso de metales pesados, desinfectantes y antimicrobianos (Choffnes *et al.*, 2010; Courvalin, 2008; Depardieu *et al.*, 2007; Gillings *et al.*, 2015; Lederberg, 2000; Stokes y Gillings, 2011). Estos últimos pueden promover la expresión de genes presentes en el genoma o en elementos extracromosomales, favorecer mutaciones puntuales en genes, o el traspaso de nuevos genes de resistencia por transferencia horizontal (Davies y Davies, 2010; Levy, 2005; Levy y Marshall, 2004; Stokes y Gillings, 2011). La tasa creciente de resistencia a los antibióticos en *Salmonella* plantea una preocupación mundial significativa, y una mejor comprensión de la distribución de los patrones de resistencia a los antibióticos es esencial para el tratamiento de infecciones. Estudios recientes han encontrado que los aislados de *Salmonella* exhiben varios perfiles de resistencia a múltiples fármacos (Mansour *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2019).

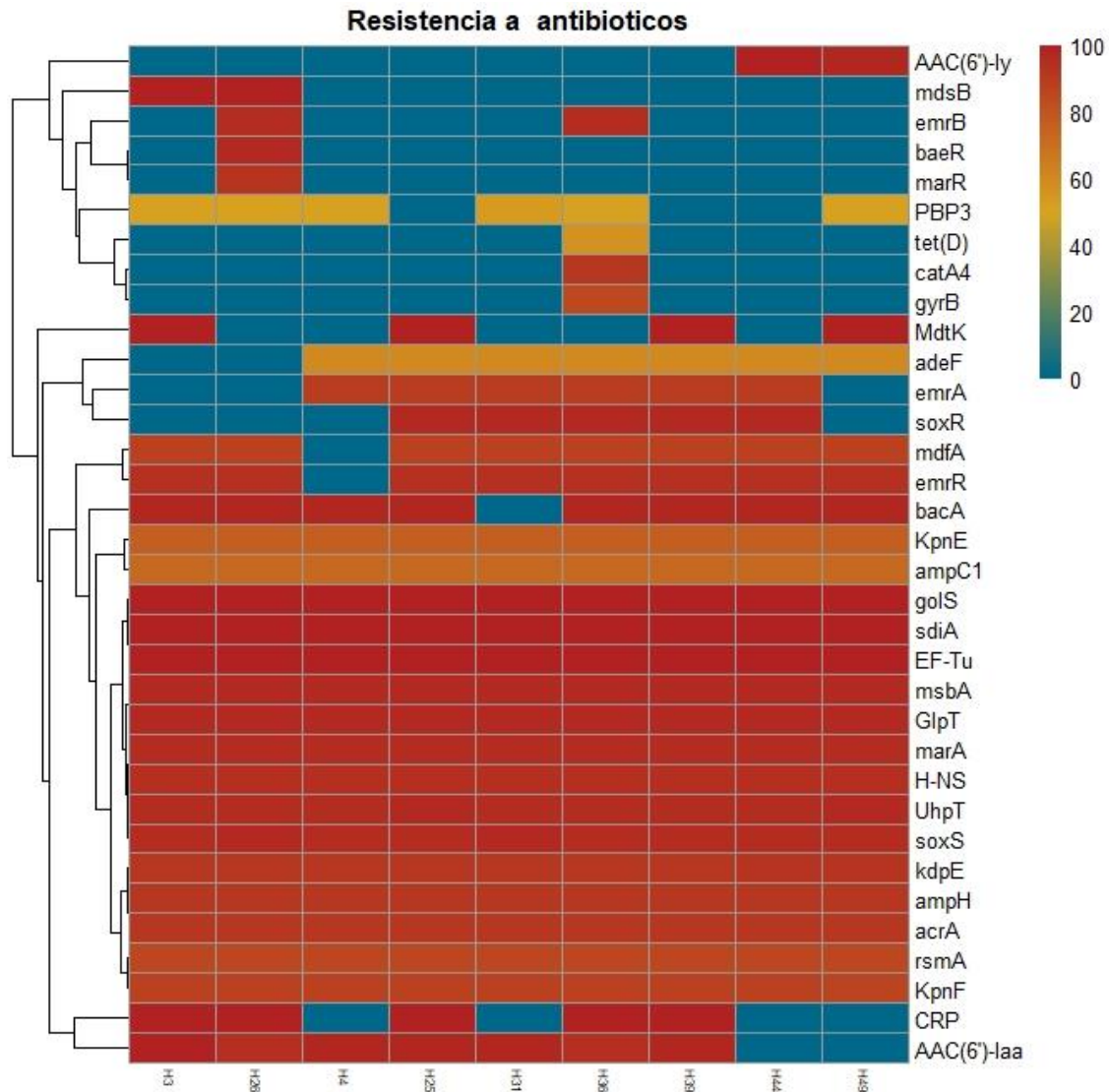


Figura 12. Mapa de calor de los genes de resistencia identificados mediante CARD. Genes de resistencia a antibióticos identificados en los nueve serotipos de *Salmonella*. Los genes de resistencia se indican de acuerdo al porcentaje de identidad. Las filas y las columnas representan los genes de resistencia y cada genoma, respectivamente.

6.7 Caracterización de los Factores de Virulencia

Los resultados obtenidos por el proceso de anotación mostraron que los genomas locales poseen genes de factores de virulencia que le permiten a *Salmonella* invadir al hospedero y desencadenar un proceso infeccioso. Los resultados mostraron que todos los serotipos predominantes en la región

de muestreo presentan al menos las primeras tres islas de patogenicidad denominadas como SPI-1, SPI-2 y SPI-3. Siendo la SPI-1, responsable de codificar las proteínas necesarias para el ensamblado del complejo T3SS, permitiéndole a la bacteria iniciar el proceso de invasión mediante la secreción de proteínas efectoras. La SPI-2 codifica un segundo T3SS como parte esencial del crecimiento intracelular, además es necesaria para llevar a cabo la parte sistemática de la infección. SPI-3 se encarga de secuestrar Mg_2^+ como parte de la adaptación cuando hay limitaciones nutricionales (Mendoza *et al.*, 2008). Las islas SPI-1 y SPI-2 son requeridas por *S. Typhimurium* para desencadenar enfermedades como gastroenteritis (Lawley *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la SPI-4 consiste en 6 genes designados *siiA-F*, los cuales intervienen en el sistema de secreción tipo I (Morgan *et al.*, 2004), siendo importantes para colonizar el intestino de bovinos, por lo que la presencia de esta isla pudiera tener un mayor impacto en la patogénesis en animales bovinos. Lo anterior supone un riesgo en animales y en humanos (por el consumo de productos contaminados). Estos resultados sugieren que las cepas encontradas en animales de granja en la región del Valle de Culiacán cuentan con islas de patogenicidad que les confieren el potencial para llevar a cabo la adherencia, invasión y desencadenar un proceso infeccioso en huéspedes tanto humanos como animales. Todo esto, finalmente, puede suponer un riesgo a la población mediante la adquisición directa de enfermedades o por el consumo de productos contaminados.

7. CONCLUSIONES

Del total de 77 muestras analizadas el 32.4% (25/77) resultó positiva a la presencia de *Salmonella*. Las heces de cerdo mostraron la mayor incidencia con el 55.5% (15/27) de las muestras positivas, seguidas de las gallinas y vacas con el 35.7% (5/14) y el 16.6% (6/36), respectivamente.

Los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Weltevreden*, *S. Havana* y *S. Sandiego* detectados en este estudio se han relacionado con brotes clínicos en humanos y animales, lo que indica la importancia de su vigilancia en la salud pública.

La presencia de genes de resistencia antibióticos y factores de virulencia en los genomas de *Salmonella* presentes en los animales representa un riesgo potencial a la salud considerando que el contenido genético de estos aislados cuenta con las características suficientes para ser potencialmente patógenas.

8. RECOMENDACIONES

Continuar con la búsqueda y caracterización genotípica y fenotípica de *Salmonella* en animales de la región. Por otra parte, estimar los posibles riesgos que implica la presencia de estos organismos en los animales.

Aumentar las actividades de vigilancia epidemiológica para identificar si los serotipos de *Salmonella* que circulan en la región están relacionados con serotipos de *Salmonella* humana aisladas durante los brotes o casos clínicos.

Conocer el nivel de divergencia de los genomas aislados.

9. REFERENCIAS

- Adeniyi, OR, Oguntunji, AO. A socio-economic survey of cultural practices and management of village poultry production in Ondo area, Nigeria. *Livestock Research for Rural Development* 2011; 23
- Afema JA, Byarugaba DK, Shah DH, Atukwase E, Nambi M, Sischo WM. 2016. Potential Sources and Transmission of *Salmonella* and Antimicrobial Resistance in Kampala, Uganda. *PLoS ONE* 11(3).
- Albuquerque, A, et al. Dissemination of *Salmonella* enteritidis by experimentally infected pigeons. *Revista Brasileira Ciência Avícola* 2013; 15(3): 211–215.
- Behraves, CB, et al., 2014 Backyard poultry flocks and Salmonellosis: a recurring, yet preventable public health challenge. *Clinical Infectious Diseases* 2014; 58(10): 1432–1438.
- Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2015). Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens. *Proceedings. Biological sciences*, 282(1821), 20150488.
- Beuchat L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce.
- Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*. 366(2):749-762.
- Brenner F.W, Villar R.G, Angulo F.J, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol*;38(7):2465–2467.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2018). Salmonellosis-nontyphoidal.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2019). *Salmonella* Home Page.
- Chousalkar, K, et al. Chasing *Salmonella* Typhimurium in free range egg production system. *Veterinary Microbiology* 2016; 192: 67–72.
- Connor BA, Schwartz E. 2005. Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*. 5:623-628.
- Crump JA, Kretsinger K, Gay K, Hoekstra RM, Vugia DJ, Hurd S, Segler SD, Megginson M, Luedeman LJ, Shiferaw B. (2008). Clinical response and outcome of infection with *Salmonella* enterica serotype Typhi with decreased susceptibility to fluoroquinolones: a United States foodnet multicenter retrospective cohort study. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52:1278-1284.
- D'Aoust J.Y. 1989. In: *Salmonella*. Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle M.P, editor. New York: Marcel Inc. pp. 327–445.
- DGE (Dirección General de Epidemiología). 2017. Anuario de Morbilidad, 1984 -2017
- D'ortenzio, E., Weill, F. X., Ragonneau, S., Lebon, J. A., Renault, P., & Pierre, V. (2008). First report of a *Salmonella* enterica serovar Weltevreden outbreak on Reunion Island, France, August 2007. *Eurosurveillance*, 13(32), 18949.
- EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks. *EFSA Journal*,

13: 3991.

- Eng S.K, Pusparajah P, Ab Mutalib N.S, Ser H.L, Chan K.G, Lee L.H. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci*;8(3):284–293.
- Figueroa, A.G.A., González, R.M., Molina, G.A., Yáñez, G.R., Espinoza, N.J. and Serna, E.M.C. 2005. Identificación de *Salmonella* spp en agua, melones cantaloupe y heces fecales de iguanas en una huerta melonera. *Medicina Interna de México*, 21: 255-258
- Forgetta V, Rempel H, Malouin F, Vaillancourt R, Topp E, Dewar K. 2012. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poult Sci*;91: 512–25.
- Gorski L. (2012). Selective enrichment media bias the types of *Salmonella* enterica strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths. *PLoS one*, 7(4), e34722.
- Green ED, Guyer MS. (2011). Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside. *Nature*. 470(7333):204-13.
- Grimont, P. A., y Weill, F. X. 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, 9,1-166.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields P.I, Bockemühl J, Grimont P.A.D, Weill F.X. 2010. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol*. 161(1):26–29.
- Gunn, J.S., Marshall, J.M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R.C. and Ryan, E.T. 2014. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis and gallbladder persistence. *Trends in Microbiology*, 22: 648–655.
- Hassan, R., Teclé, S., Adcock, B., Kellis, M., Weiss, J., Saupe, A & Neil, K. P. (2018). Multistate outbreak of *Salmonella* Paratyphi B variant L (+) tartrate (+) and *Salmonella* Weltevreden infections linked to imported frozen raw tuna: USA, March–July 2015. *Epidemiology & Infection*, 146(11), 1461-1467.
- Hirakawa H, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A. 2003. Comprehensive studies of drug resistance mediated by overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:1851–1856.
- Hoelzer, K., Moreno Switt, A.I. & Wiedmann, M. 2011. Animal contact as a source of human nontyphoidal salmonellosis. *Vet Res* 42, 34.
- Hohmann EL. (2001). Nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Disease*. 15(32):263–269.
- Hugas, M., & Beloeil, P. A. (2014). Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union-progress over the last ten years. *Eurosurveillance*, 19(19), 20804
- Jacobsen, C. S., & Bech, T. B. (2012). Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International*, 557-566
- Jajere S. M. (2019). A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary world*, 12(4), 504–521.
- Jiménez, M., Martínez-Urtaza, J. and Chaidez, C. 2011. Geographical and Temporal Dissemination of *Salmonella* Isolated from Domestic Animal Hosts in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial Ecology*, 61: 811-820

- Kauffmann F. 1941. A typical variant and a new serological variation in the *Salmonella* group. *J. Bacteriol.* 41(2):127–141.
- Kaufmann M., Zweifel C., Blanco M., Blanco J.E. y Blanco J. 2006. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. *J Food Prot* 69:260–266
- Kyung-Min Lee, Mick Runyon, Timothy J. Herrman, Robert Phillips, John Hsieh. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276.
- Lander ES. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 2011;470(7333):187-97.
- Le Minor L. 1991 The genus *Salmonella*. In: Balows A, Truper H.G, Dworkin C, Harder W, Scheilfer K.H, editors. *The Prokaryotes*. New York: Springer-Varlag. pp. 2760–2774.
- Li, K, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella* enterica serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China. *Food Control* 2017; 72(Part A): 36–42.
- Literák, I., Vanko, R., Dolejská, M., Čížek, A., and Karpíšková, R. 2007. Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Letters in Applied Microbiology*, 45(6), 616–621.
- Magnet S, Courvalin P, 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* 181:6650–6655
- Malorny B, Junker E, Helmuth R. 2008. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis. *BMC Microbiol.*8: 84.
- Mansour MN, Yaghi J, El Khoury A, Felten A, Mistou MY, Atoui A, et al. Prediction of *Salmonella* serovars isolated from clinical and food matrices in Lebanon and genomic-based investigation focusing on Enteritidis serovar. *Int J Food Microbiol.* 2020;333: 108831.
- Nadon, C., Van Walle, I., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., ... & Carleton, H. (2017). PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Eurosurveillance*, 22(23), 30544.
- Newell DG. 2001. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. *Symposium series Society for Applied Microbiology* 30: 57-67.
- Perron GG, Quessy S, Bell G. 2008. A reservoir of drug-resistant pathogenic bacteria in asymptomatic hosts. *PLoS ONE* 3:3749.
- Pesciaroli, M, et al. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology* 2017; 242: 82–86.
- Ramirez-Hernandez A, Carrascal-Camacho AK, Varón-García A, Brashears MM, Sanchez-Plata MX. Genotypic characterization of antimicrobial resistant *Salmonella* spp. strains from three poultry processing plants in Colombia. *Foods*. 2021;10:491.

- Reeves M.W, Evins G.M, Heiba A.A, Plikaytis B.D, Farmer J.J. 1989. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* Comb. J. Clin. Microbiol. 27(2):313–320.
- Rostagno, MH, Eicher, SD, Lay, DC. Immunological, physiological, and behavioral effects of *Salmonella* enterica carriage and shedding in experimentally infected finishing pigs. Foodborne Pathogens and Disease 2011; 8(5): 623–630.
- Saikia, L., Sharma, A., Nath, R., Choudhury, G., & Borah, A. K. (2015). *Salmonella* Weltevreden food poisoning in a tea garden of Assam: An outbreak investigation. Indian Journal of Medical Microbiology, 33(4), 503-506.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. (2011). Foodborne illness acquired in the United States major pathogens. Emerging Infectious Diseases. 17:7-15.
- Sheorey H, Darby J. (2008). Searching for *Salmonella*. Australian Family Physician. 37:806-810.
- Shu-Kee, E., Priyia, P., Nurul-Syakima, A. M., Hooi-Leng, S., Kok-Gan, C., & Learn-Han, L. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. Frontiers in Life Science, 1-11.
- Silva-Hidalgo, G., López-Valenzuela, M., Cárcamo-Aréchiga, N., Cota-Guajardo, S., López-Salazar, M. and Montiel-Vázquez, E. 2016. Identification of bapA in strains of *Salmonella* enterica subsp. enterica Isolated from Wild Animals Kept in Captivity in Sinaloa, Mexico. Veterinary Medicine International, 2016: 1-4.
- Silva-Hidalgo, G., Ortiz-Navarrete, V.F., Alpuche-Aranda, C.M., Rendón-Maldonado, J.G., López-Valenzuela, M. and Juárez-Barranco, F. 2012. Non-typhi *Salmonella* serovars found in Mexican zoo animals. Research in Veterinary Science, 93: 1132-1135.
- SINAVE. 2020. Boletín epidemiológico. Num. 18, Vol 37. Semana 44. Disponible de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/direccion-general-de-epidemiologia-boletin-epidemiologico> (Consultado el 15 de Noviembre de 2020).
- Smith SE, Showers-Corneli P, Dardenne CN, Harpending HH, Martin DP, Beiko RG. Comparative genomic and phylogenetic approaches to characterize the role of genetic recombination in mycobacterial evolution. PLoS One. 2012;7: e50070.
- Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Mondal A, Rajamohan G. 2012. Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. PLoS One
- Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe R V. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis. 7: 382–9.
- Syed, ST, Gerber, BS, Sharp, LK. Traveling towards disease: transportation barriers to health care access. Journal of Community Health 2013; 38(5): 976–993. doi: 10.1007/s10900-013-9681-
- Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, et al. Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. Genome Res. 2008;18: 1624–37.

- U.S. Food and Drug Administration. (2003). *Salmonella*, chap.5. In Bacteriological analytical manual online. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>. Acceso 16 de Febrero 2022.
- Wilkins, W, 2010. Examining heterogeneity in the diagnostic accuracy of culture and PCR for *Salmonella* spp. in Swine: a systematic review/meta-regression approach. *Zoonoses and Public Health*.
- Zaidi, M.B., Calva, J.J., Estrada-García, M.T., León, V., Vázquez, G. and Figueroa, G. 2008. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp in Mexico. *Emerging Infectious Disease*, 14: 429-435.
- Zhang, J., Peng, Z., Chen, K., Zhan, Z., Shen, H., Feng, S., & Liao, M. (2021). Population genomics of *Salmonella* enterica serovar Weltevreden ST365, an emerging predominant causative agent of diarrheal disease. *bioRxiv*.