



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional Posgrado Biotecnología
Maestría en Ciencias con Orientación en
Biotecnología

**Diversidad genética, capacidad de
supervivencia y potencial patogénico de
serotipos de *Salmonella* aislados en ríos de
Culiacán, Sinaloa**

T E S I S

que presenta

Areli Burgueño Román

para obtener

el grado de

**Doctor en Ciencias con Orientación
en Biotecnología Ambiental**

Director de Tesis

Dra Maribel Jiménez Edeza

Dra Gloria Marisol Casteñeda Ruelas

Culiacán Rosales, SIN, MEX

Marzo 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 03 del mes marzo del año 2021, la que suscribe Areli Burgueño Roman alumna del Programa de Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología Ambiental con número de cuenta 06069381, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Maribel Jiménez Edeza y Dra. Gloria Marisol Castañeda Ruelas y cede los derechos del trabajo titulado "Diversidad genética, capacidad de supervivencia y potencial patogénico de serotipos de *Salmonella* aislados en ríos de Culiacán, Sinaloa", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Presentación

La presente investigación, titulada **“Diversidad genética, capacidad de supervivencia y potencial patogénico de serotipos de *Salmonella* aislados en ríos de Culiacán, Sinaloa”** se llevó a cabo en el “Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico”, Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, Dr. José Giovanni Romero Quintana, Dra. Claudia del Rosario León Sicaños, Dra. Gloria Marisol Castañeda Ruelas (Director de Tesis) y Dra. Maribel Jiménez Edeza (Directora de Tesis) participaron como Asesores Académicos. La C. Areli Burgueño Román recibió “Beca Nacional para Estudios de Posgrado (Doctorado en Ciencias)” por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante sus estudios de posgrado. Este trabajo de investigación forma parte del proyecto “Estudio del perfil fenotípico, genotípico y potencial patogénico de poblaciones dominantes de *Salmonella enterica* aisladas de ríos del Estado de Sinaloa” y contó con el financiamiento del fondo SEP/SEB-CONACYT 2014, No. de proyecto 235989, bajo la responsabilidad técnica de la Dra. Maribel Jiménez Edeza.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas y al Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología por brindarme la oportunidad realizar mis estudios de posgrado y contribuir en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado y oportunidad para estudiar un posgrado.

Al Laboratorio de Investigación y Diagnostico Microbiológico (LIDiM) por abrir un espacio para la realización el proyecto de investigación.

A la Dra. Maribel Jiménez y a la Dra. Marisol Castañeda por aceptar dirigir este trabajo de investigación y darme la oportunidad de continuar en el ámbito de la investigación científica; también agradezco por compartir sus conocimientos y experiencias, y brindarme su confianza y apoyo incondicional.

A mis asesores de tesis Dr. José Guadalupe Rendón Maldonado, Dra. Claudia León Sicaños y Dr. Geovanni Romero por aceptar ser parte de este trabajo de investigación, por su apoyo incondicional, valiosos consejos y disponibilidad durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de posgrado y compañeros de laboratorio por su apoyo pero sobre todo por su amistad.

A mi familia por el amor recibido, la dedicación y la paciencia transmitida durante todo el desarrollo del trabajo de investigación. Gracias por ser los principales promotores de mis sueños.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE CUADROS	XI
I RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISION BIBLIOGRÁFICA	6
A GENERALIDADES DE <i>Salmonella</i>	6
B CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA	6
C SEROTIPOS	10
D RUTA DE CONTAMINACIÓN	11
E DISEMINACIÓN DE <i>Salmonella</i>	13
F <i>Salmonella</i> EN AMBIENTES ACUATICOS	14
G ENFERMEDAD POR <i>Salmonella</i>	16
H EPIDEMIOLOGÍA	19
I CICLO INFECCIOSO DE <i>Salmonella</i>	21
1 Fase intestinal	22
2 Fase sistémica	23
J POTENCIAL PATOGENICO	26
1 Adherencia	27
2 Invasión	28
3 Supervivencia intracelular	32
4 Daño celular	34
K DIVERSIDAD GENÓMICA	38
L MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENICIDAD	40
1 Adhesinas	41
2 Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	42
3 Sistemas de secreción tipo III	45
4 Plásmidos y profagos	47
5 Regulación de la expresión de factores de virulencia	47
M ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA DE <i>Salmonella</i> EN AMBIENTES ESTRESANTES	51
1 Estrés oxidativo	52
2 Estrés a pH ácido	53
3 Estrés por inanición	54
IV JUSTIFICACIÓN	56
V HIPOTESIS	57
VI OBJETIVOS	58
A OBJETIVO GENERAL	58

	B OBJETIVOS ESPECIFICOS	58
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	59
	A CEPAS BACTERIANAS	59
	B ANOTACIÓN DE GENOMAS	62
	C ANÁLISIS FILOGENÉTICO	62
	D ANÁLISIS DEL PANGENOMA DE CEPAS NTS	62
	E POTENCIAL PATOGENICO <i>in silico</i>	63
	1 Virulotipificación	63
	2 Diagrama de ven para genes de patogenicidad	64
	F POTENCIAL PATOGENICO <i>in vitro</i>	64
	1 Reactivación de cepas bacterianas	64
	2 Líneas celulares	65
	3 Conteo celular	65
	4 Preparación del inóculo bacteriano	66
	5 Ensayo de adherencia e invasión	67
	6 Ensayo de supervivencia intracelular	68
	7 Viabilidad celular	69
	G ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA	70
	1 Ensayo de supervivencia a peróxido de hidrógeno	70
	2 Ensayo de supervivencia a nitrito de sodio	70
	3 Ensayo de supervivencia a pH ácido	71
	4 Ensayo de supervivencia a inanición	71
	H ANÁLISIS ESTADÍSTICO	72
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
	A CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS GENOMAS	74
	B ANÁLISIS FILOGENÉTICO	81
	C PANGENOMA DE CEPAS NTS	83
	D CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES GENERALES	88
	E ANÁLISIS DE LAS CARACTERISTICAS PATOGENICAS	91
	1 Coregenome de virulencia	91
	2 Virulotipificación	96
	F POTENCIAL PATOGENICO <i>in vitro</i>	101
	1 Capacidad de adherencia	101
	2 Capacidad de invasión	104
	3 Eficiencia de invasión	108
	4 Supervivencia intracelular	110
	5 Viabilidad celular	118
	G ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA	121
	1 Supervivencia a peróxido de hidrógeno	122
	2 Supervivencia a nitrito de sodio	124
	3 Supervivencia a pH ácido	126

	4 Supervivencia a inanición	128
IX	CONCLUSIONES	135
X	BIBLIOGRAFÍA	137
	Abreviaturas	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Ciclo de vida de <i>Salmonella</i> a través del hospedero y el ambiente externo	12
2	Ciclo infeccioso de <i>Salmonella</i>	25
3	Invasión celular por <i>Salmonella</i>	31
4	Muerte celular programada por la infección con <i>Salmonella</i>	37
5	Representación esquemática de los genes dentro de las SPI I y II	44
6	Representación esquemática del T3SS-1 y T3SS-2 y sus proteínas estructurales	46
7	Estadísticas del contenido genómico de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	78
8	Gráfica de barras de la media y coeficiente de variación (%) de las estadísticas genómicas de las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	79
9	Análisis de componentes principales de las estadísticas genómicas de las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	80
10	Análisis filogenético de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	82
11	Pangenoma de secuencias genómicas de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México	85
12	Pangenoma de CDSs de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México	86
13	Diagrama de flores que ilustra el número de CDS únicos para cada cepa NTS (en los pétalos) y el coregenoma de <i>Salmonella enterica</i> (en el medio)	87
14	Genes asignados categorías COG, Pfam y KEGG de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México	90
15	Coregenome de genes de virulencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	94
16	Factores moleculares de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	99
17	Índice de patogenicidad de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	100

18	Capacidad de adherencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2	103
19	Capacidad de invasión de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2	107
20	Eficiencia de invasión de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2	109
21	Morfología de la activación de la línea celular de macrófagos RAW 264.7	113
22	Cinética de supervivencia intracelular de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7	114
23	Efectos principales para la cinética de supervivencia intracelular (UFC/mL) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7	115
24	Efectos principales para la cinética de supervivencia intracelular (UFC/mL) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en diferentes tiempos de infección	116
25	Comparación entre el primer tiempo de infección (1h) y el tiempo final (48h) de la curva de supervivencia intracelular de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7	117
26	Viabilidad de la línea celular epitelial humana Caco-2 después de 48 h de infección con cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	120
27	Supervivencia a la exposición a peróxido de hidrogeno de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	123
28	Supervivencia a la exposición a nitrito de sodio de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	125
29	Supervivencia a la exposición a pH ácido (pH 3.0) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	127
30	Supervivencia a inanición de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	130
31	Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de un día de limitación de nutrientes	131

32	Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 2 días de limitación de nutrientes	132
33	Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 4 días de limitación de nutrientes	133
34	Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 8 días de limitación de nutrientes	134

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Especies y subespecies del género <i>Salmonella</i>	9
2	Cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	61
3	Códigos de acceso a bases de datos públicas de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa	77
4	Genes con funciones relacionadas con virulencia de cepas NTS aisladas de agua de río	93
5	Virulotipos mostrados por genes únicos y accesorios de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán Sinaloa	95

I RESUMEN

Salmonella es una de los principales patógenos transmitidos por los alimentos alrededor del mundo. Los serotipos mayormente asociados a enfermedades en seres humanos son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, pero también, otros serotipos de *Salmonella* no tifoideos (NTS) presentes en el medio ambiente han sido asociados a brotes epidemiológicos. En Culiacán, Sinaloa se ha reportado la presencia de diferentes serotipos NTS en agua de río, los cuales no corresponden a los principalmente asociados a enfermedades en seres humanos. La presencia de la bacteria en el medio ambiente puede interferir en su adaptación y en su virulencia. A pesar de esto, la caracterización de la diversidad genómica y virulencia de serotipos NTS aislados del medio ambiente, no ha sido ampliamente explorada. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la diversidad genómica, potencial patogénico y estrategias de supervivencia de serotipos NTS aislados de agua de río. Para ello, se estudiaron siete genomas de cepas de serotipos NTS aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Las secuencias de las cepas NTS se anotaron estructural y funcionalmente mediante plataformas de bioinformática para describir los atributos del genoma. Para la descripción del ciclo patogénico y definición de patotipos de las cepas se empleó la integración de métodos *in silico* e *in vitro* (utilizando modelos de líneas celulares). Las estrategias de adaptación y supervivencia se evaluaron *in vitro* mediante exposición a radicales libres, pH ácido e inanición. El análisis filogenético evidencia su relación cercana, pero su contenido genómico las clasificó en tres *clados*. Se observó un pangenoma abierto evidenciando regiones únicas del genoma contribuidas por las cepas NTS. Las cepas NTS mostraron un alto perfil de virulencia con resistencia a las condiciones de estrés evaluadas. Todo esto permitió conocer la diversidad genómica de las cepas NTS circulantes en la región, y generar un perfil de virulencia de la bacteria, con el propósito de generar información oportuna que permita establecer medidas de control adecuadas.

Palabras clave: *Salmonella*, patogenicidad, virulencia, gen, genoma

ABSTRACT

Salmonella is one of the main foodborne pathogens around the world. The serotypes most associated with diseases in humans are *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*, but other non-typhoid *Salmonella* serotypes (NTS) present in the environment have also been associated with epidemiological outbreaks. In Culiacán, Sinaloa, the presence of different NTS serotypes has been reported in river water, which do not correspond to those mainly associated with diseases in humans. The presence of the bacteria in the environment can interfere with their adaptation and virulence. Despite this, the characterization of the genomic diversity and virulence of NTS serotypes isolated from the environment has not been widely explored. The present study aimed to determine the genomic diversity, pathogenic potential and survival strategies of NTS serotypes isolated from river water. For this, seven genomes of strains of NTS serotypes isolated from river water in Culiacán, Sinaloa, were studied. The sequences of the NTS strains were structurally and functionally annotated using bioinformatics platforms to describe the attributes of the genome. For the description of the pathogenic cycle and definition of the pathotypes of the strains, the integration of *in silico* and *in vitro* methods (using cell line models) was used. Adaptation and survival strategies were evaluated *in vitro* by exposure to free radicals, acid pH, and starvation. Phylogenetic analysis shows their close relationship, but their genomic content classified them into three clades. An open pangenome was observed showing unique regions of the genome contributed by the NTS strains. The NTS strains showed a high virulence profile with resistance to the stress conditions evaluated. All this allowed us to know the genomic diversity of the NTS strains circulating in the region, and to generate a virulence profile of the bacteria, with the purpose of generating timely information that allows establishing adequate control measures.

Key words: *Salmonella, pathogenicity, virulence, gene, genome*

II INTRODUCCIÓN

En México, las enfermedades gastrointestinales son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, por lo que se les considera un problema de salud pública nacional (Hernández y col., 2011). *Salmonella* es uno de los principales agentes causales de infecciones gastrointestinales (SINAVE/DGE, 2012). El consumo de agua y alimentos contaminados con la bacteria son la principal vía de infección (López y col., 2012). Esta bacteria tiene un amplio rango de hospederos de sangre caliente, y su principal vía de eliminación es a través de las heces, lo cual ayuda a su rápida diseminación en el medio ambiente; esto contribuye a que la bacteria sea uno de los patógenos más ubicuos en la naturaleza (WHO, 2008). La prevalencia y distribución geográfica, amplio rango de hospedero, así como la plasticidad genómica de *Salmonella*, ha determinado la diversidad genotípica y fenotípica entre cepas, las cuales contienen una amplia diversidad de genes cromosómicos y plasmídicos que pueden estar relacionados con cambios adaptativos que favorecen su supervivencia en diferentes hospederos (Retamal y col., 2015).

La infección con *Salmonella* es el resultado de la expresión de factores de virulencia que interactúan con células hospederas. Estos factores de virulencia juegan papeles importantes en diferentes mecanismos patogénicos como adherencia, invasión, supervivencia intracelular, expresión de fimbrias y resistencia a antibióticos (Elemfareji y Thong, 2013). Muchos de estos factores de virulencia están localizados en islas de patogenicidad (SPI, siglas en inglés).

Al menos 17 SPI han sido identificadas dentro del genoma de *Salmonella*; sin embargo, las SPI 1 y 2 son las más estudiadas; estas SPI's codifican dos sistemas de secreción tipo III (T3SS, siglas en inglés), T3SS-1 y T3SS-2, respectivamente. Diversos trabajos han demostrado la presencia de diferentes serotipos de *Salmonella* en ambientes acuáticos en Culiacán, Sinaloa (López y col. 2009, Jiménez y col., 2011; Estrada-Acosta y col. 2014; Jiménez y col. 2014). Cuando *Salmonella* se encuentra en un nuevo ambiente se enfrenta a condiciones adversas que pueden comprometer el proceso de adaptación y la capacidad patogénica de la bacteria (Winfield y Groisman, 2003; Spector y Kenyon, 2012). Aun cuando los mecanismos de patogenicidad están claramente identificados en cepas infecciosas de origen clínico Typhimurium y Enteritidis, se desconocen los detalles de la capacidad infectiva de cepas que han permanecido por largos periodos de tiempo en el medio ambiente y que pudieran haber comprometido su capacidad patogénica (Ohl y Miller 2001). A pesar de esto, brotes epidemiológicos en Estados Unidos de América, sustentan que hortalizas exportadas de México han sido vehículos de infección, e identifican a serotipos NTS presentes en el medio ambiente, como el agua de irrigación, como responsables de estos brotes.

Por ello, resulta indispensable intensificar el estudio de microorganismos patógenos en el medio ambiente, para lograr entender las variantes poblacionales de *Salmonella*, en especial en ríos de Culiacán, Sinaloa. Este estudio se realizó utilizando técnicas de epidemiología molecular que permiten

definir la biología de los diversos serotipos NTS circulantes en la región, y establecer la importancia del hábitat en la diseminación de este patógeno. Esta información es imprescindible para diseñar estrategias de control por las autoridades sanitarias, que permitan establecer medidas de contención de enfermedades, restauración del ambiente, disminución de impactos sanitarios y de pérdidas económicas colaterales.

Por todo esto, el objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genómica, potencial patogénico y estrategias de adaptación y supervivencia en el medio ambiente de serotipos NTS aislados de agua de río.

III REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A GENERALIDADES DE *Salmonella*

Salmonella spp. es una bacteria en forma de bacilo, Gram negativa, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, y es considerada como un microorganismo patógeno intracelular facultativo, su tamaño puede variar entre 0.4 a 0.6 μm de diámetro por 2 a 3 μm de longitud, presentan un contenido de guanina-citosina (G+C) de 50-53 % (Khan, 2014). Tiene respiración aerobia y anaerobia facultativa, fermenta glucosa, maltosa y manitol, pero no fermenta lactosa ni sacarosa, no tiene la capacidad de formar cápsula, a excepción de algunos serotipos, no forma esporas, presenta fimbrias y pilis, y generalmente es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos (González y col., 2014). *Salmonella* crece en un amplio intervalo de temperatura 2 °C a 54 °C, mientras que su crecimiento óptimo es de 35 °C a 37 °C; crece a un pH entre 3.9 y 9.5, y concentraciones de sal (NaCl) de 0.4 a 4 %. La actividad de agua (A_w) a la cual se desarrolla adecuadamente es de 0.94 a 0.99, pero A_w de 0.2 también pueden permitir su crecimiento (Spector y Kenyon, 2012; González y col., 2014).

B CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Salmonella fue descubierta y aislada de intestinos de cerdos infectados con peste porcina clásica, por el científico Theobald Smith en el año de 1855; sin embargo, la bacteria fue nombrada en honor a Daniel Elmer Salmon (Eng y col., 2015). Actualmente, el centro para el control y prevención de enfermedades

(**CDC**, siglas en inglés) usa el sistema de nomenclatura de *Salmonella* recomendado por la organización mundial de la salud (WHO, siglas en inglés) (Eng y col., 2015; Popoff y col., 2003). De acuerdo con este sistema, el género *Salmonella* se divide en dos especies: *enterica* y *bongori*, basándose en las diferencias en el análisis de secuencia de rRNA 16S (Khan, 2014; Eng y col., 2015). *Salmonella enterica* es la mayormente asociada a enfermedades en humanos y puede ser clasificada en seis subespecies basándose en su relación genómica y propiedades bioquímicas. Estas subespecies son designadas por nombre taxonómico; comúnmente abreviadas con números romanos del I al VI (**Cuadro 1**) (CDC, 2011, Eng y col., 2015).

Además de la clasificación en subespecies basado en la filogenética de *Salmonella*, esta bacteria también se clasifica basados en la presencia de diferentes antígenos de superficie, en más de 2,500 serovares o serotipos, de acuerdo al esquema establecido por Kauffman y White (Khan, 2014). Estos antígenos incluyen, antígeno flagelar (H), antígeno somático (O), presente en los lipopolisacáridos (LPS) que componen la membrana externa de la pared celular, y el antígeno capsular (K), que se encuentra presente en la superficie capsular y es el menos encontrado (Romero, 2007; Eng y col., 2015). El antígeno de virulencia (Vi), es un subtipo especial de antígeno K, que es encontrado solo en los serotipos Paratyphi C, Dublin y Typhi (Eng y col., 2015).

Una manera más simple en la que se clasifica *Salmonella* es realizando reacciones de aglutinación utilizando anticuerpos específicos para el antígeno somático O, con lo cual se puede clasificar a la bacteria en seis grupos designados como A, B, C1, C2, D y E (Eng y col., 2015).

Cuadro 1. Especies y subespecies del género *Salmonella*.

Espece	Subespecies (grupo)
<i>enterica</i>	<i>enterica</i> (I)
	<i>salamae</i> (II)
	<i>arizonae</i> (IIIa)
	<i>diarizonae</i> (IIIb)
	<i>houtenae</i> (IV)
	<i>indica</i> (VI)
<i>bongori</i>	<i>bongori</i> (V)

CDC (2011)

C SEROTIPOS

Los serotipos de *Salmonella* son designados mediante serotipificación (cada uno es una combinación única de antígeno O, H1 y H2), basada en la variabilidad antigénica de dos antígenos de superficie. Se conocen 46 y 114 formas de antígenos O y H, respectivamente. *Salmonella* es el único miembro de la familia Enterobacteriaceae, que porta dos genes para flagelina que codifican las variantes H1 y H2 del antígeno H, estas variantes son reguladas coordinadamente (González y col., 2014; Eng y col., 2015). Desde el 2007, se han descrito más de 2,579 serotipos de *Salmonella*, de los cuales, cerca del 60 % pertenecen a la subespecie I (*Salmonella enterica* subespecie *enterica*), y habitan el tracto intestinal de seres humanos y animales de sangre caliente, algunos de ellos muestran especificidad de hospedero; mientras que otros son promiscuos (Khan, 2014). El 99 % de las infecciones en seres humanos y animales de sangre caliente son producidas por serotipos que pertenecen a la subespecie I (Velge y col., 2012; Eng y col., 2015). Por el contrario, las demás subespecies de *S. enterica* y *S. bongori* son encontradas mayormente en el medio ambiente y animales de sangre fría, y raramente son encontradas en seres humanos (Eng y col., 2015).

En México, Gutiérrez-Cogco y col. (2000) analizaron serotipos de *Salmonella* aislados de muestras clínicas obtenidas de laboratorios de salud pública y privados de la República Mexicana. El principal serotipo encontrado fue *S. Typhimurium*, seguido de *S. Enteritidis*, ambos pertenecientes a la subespecie I.

En ese mismo estudio se analizaron serotipos de *Salmonella* aislados de muestras de alimentos y muestras ambientales, encontrando a *S. Derby* y *S. Anatum* como los principales serotipos de *Salmonella*; ambos serotipos también pertenecen a la subespecie I.

D RUTA DE CONTAMINACIÓN

Salmonella llega al medio ambiente a través de heces de animales y seres humanos (Fegan y col., 2005), y puede ser diseminada en el medio ambiente a través de vehículos ambientales como lluvia y cuerpos de agua; permanece en el ambiente y, bajo condiciones favorables, sobrevive durante semanas en agua y durante años en el suelo (Winfield y Groisman, 2003). Una vez que la bacteria se encuentra en el ambiente puede desencadenar mecanismo de adaptación como entrar en un estado de latencia, en el cual la bacteria se encuentra viable pero no cultivable (VBNC, siglas en inglés), permaneciendo así por periodos de tiempo prolongados (Spector y Kenyon, 2012). En este estado, *Salmonella* sobrevive a factores ambientales adversos; como variaciones en el pH, concentraciones de sal, temperaturas altas y bajas, baja disponibilidad de nutrientes (carbono, fosfato y nitrógeno), estrés osmótico y toxinas; para posteriormente reiniciar el ciclo infectando a un hospedero (**Fig. 1**) (Winfield y Groisman, 2003; Spector y Kenyon, 2012).

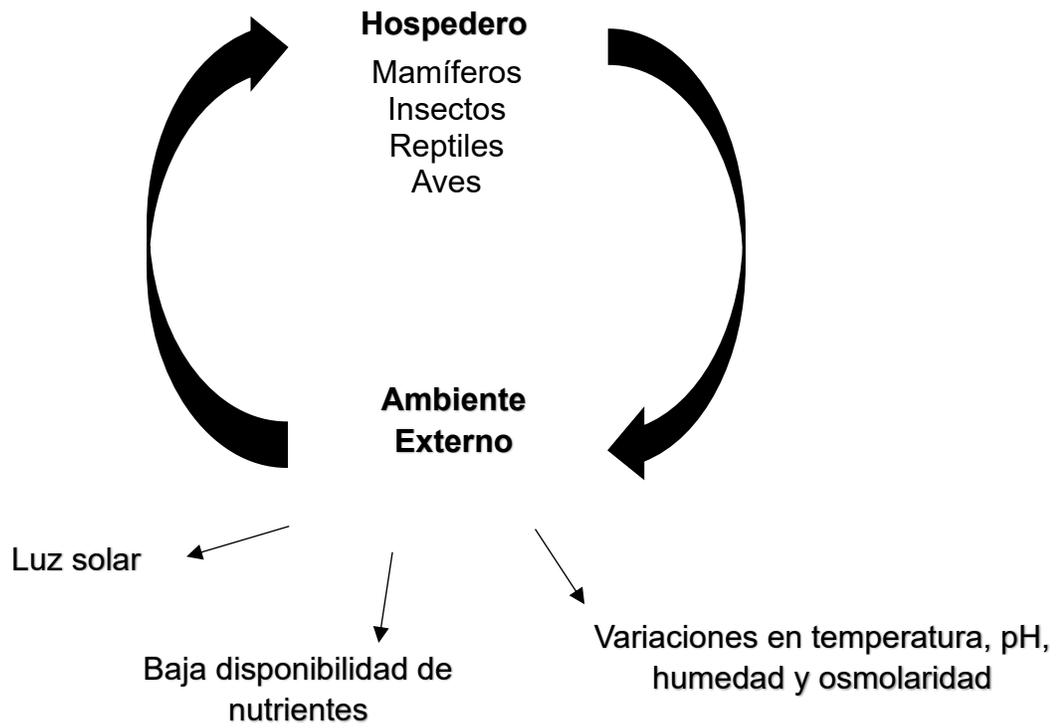


Fig. 1. Ciclo de vida de *Salmonella* a través del hospedero y el ambiente externo.

Winfield y Groisman (2003).

E DISEMINACIÓN DE *Salmonella*

Salmonella tienen como hábitat natural el tracto digestivo de animales de sangre caliente, y la principal vía de eliminación de la bacteria es a través de las heces; tiene un amplio rango de hospederos, incluyendo al ser humano y animales domésticos y de vida silvestre, lo cual le ayuda a diseminarse rápidamente en el medio ambiente, por esto, esta bacteria es uno de los patógenos más ubicuos en la naturaleza (WHO, 2008). La extensa distribución geográfica, amplio rango de hospedero además de la plasticidad del genoma de la bacteria, ha determinado la diversidad genotípica y fenotípica entre cepas, las cuales contienen un gran número de genes cromosómicos y plasmídicos que pueden estar relacionados con cambios adaptativos que favorecen su supervivencia en diferentes hospederos (Retamal y col., 2015).

Para poder sobrevivir a cambios en el medio ambiente las bacterias son capaces de responder rápida y apropiadamente a una gran variedad de condiciones estresantes como la baja disponibilidad de nutrientes y variaciones en temperatura, pH, humedad y osmolaridad (Winfield y Groisman, 2003; Spector y Kenyon, 2012). La capacidad de respuesta de una bacteria a las diferentes condiciones en las que se puede encontrar es particularmente importante para patógenos transmitidos por alimentos, como es el caso de *Salmonella*, ya que se puede enfrentar a condiciones potencialmente inhóspitas en prácticamente todos los ambientes, como suelo, cuerpos de agua, plantas procesadoras y hospedero.

La respuesta a esas condiciones no solo impacta en la supervivencia y crecimiento de la bacteria, sino que también pueden modificar la capacidad de virulencia y multiresistencia a antimicrobianos (Spector y Kenyon, 2012).

Una de las principales condiciones de estrés para *Salmonella*, tanto en ambientes externos como en células hospederas, es la disminución de fuentes de carbono, fósforo y nitrógeno, para lo cual la bacteria desarrolla un sistema de respuesta a la escasez de nutrientes (SSR, siglas en inglés) mediante el cual se genera cambios genéticos y fisiológicos en la célula bacteriana (Foster y Spector, 1995; Spector y Kenyon, 2012). La SSR permite a la bacteria sobrevivir durante prolongados periodos de tiempo, además de proveerle resistencia a diferentes factores ambientales, como temperatura, pH y osmolaridad, así como a péptidos antimicrobianos (Foster y Spector, 1995). La habilidad de *Salmonella* para permanecer viable por largos periodos de tiempo bajo diferentes cambios en el ambiente externo, es crítico para su capacidad de sobrevivir y diseminarse en el medio ambiente (Martínez-Urtaza y col., 2004).

***F Salmonella* EN AMBIENTES ACUÁTICOS**

Esta bacteria es uno de los patógenos más ubicuos en la naturaleza. Aproximadamente el 60 % de los serotipos de *Salmonella* tienen como hábitat natural el tracto digestivo de animales de sangre caliente, por lo tanto, la principal vía de eliminación de la bacteria es a través de las heces; y encuentran el agua como principal vía de diseminación, en donde, en época de lluvia *Salmonella*

tiene mayor presencia y concentración en los cuerpos de agua (ríos y canales) por efecto del arrastre de materia orgánica contaminada (Martínez-Urtaza y col., 2004; Simental y Martínez-Urtaza, 2008).

En la región central de Sinaloa, específicamente en el valle de Culiacán se han identificado y caracterizado serotipos de *Salmonella* circulantes en el medio ambiente. En un estudio realizado en el Zoológico de Culiacán, Sinaloa, se reportó la distribución de varios serotipos de *Salmonella* en muestras de heces de animales, insectos y muestras de alimentos de los animales del zoológico; entre los serotipos aislados se incluyeron S. 3.10,H:r:- (2.24 %), S. Weltevreden (2.24 %), S. Braenderup (1.87 %), S. San Diego (1.49 %), S. Derby (1.49 %), S. Oranienburg (1.12 %) y S. 6,7,H:en x:- (1.12 %) (Silva-Hidalgo y col., 2012). En el mismo sentido, Jiménez y col. (2011) aislaron 20 serotipos de *Salmonella*, siendo S. Oranienburg (25 %), S. Give (14 %), S. Saintpaul (12 %) y S. Minnesota (11 %) los principalmente aislados en muestras de heces de animales recolectadas en el valle de Culiacán, Sinaloa; es de importancia la presencia de serotipos de *Salmonella* en heces, ya que las heces son la principal fuente de contaminación de ambientes acuáticos. Por su parte, Estrada-Acosta y col. (2014) identificaron la presencia de 8 serotipos de *Salmonella* en agua de canal, siendo S. Oranienburg el más prevalente (36 %), seguido de S. Saintpaul (28 %) y S. Give (14 %). En otro estudio, Jiménez y col. (2014) aislaron diferentes serotipos de *Salmonella* de agua de río en el Valle de Culiacán; en este estudio, en el cual se realizaron muestreos bisemanales durante un periodo de 1 año, se

detectó la presencia de *Salmonella* spp. en el 80 % de las muestras analizadas y de estas, el 25 % fueron *S. Oranienburg*, 9 % *S. Saintpaul* y 6 % *S. Minnesota*.

G ENFERMEDAD POR *Salmonella*

Salmonella puede causar dos principales tipos de enfermedad, salmonelosis no tifoidea (gastroenteritis) y fiebre tifoidea, ambas pueden progresar a cuadros clínicos invasivos y severos, que pueden poner en peligro la vida de las personas que lo padecen. Las enfermedades causadas por *Salmonella* son de gran impacto en salud pública, puesto que se reportan millones de casos cada año en el mundo. Las cefalosporinas y fluoroquinolonas son los antibióticos más utilizados para su tratamiento (Khan, 2014). Sin embargo, se han identificado cepas de *Salmonella* con múltiple resistencia a los antibióticos de elección, por lo que se dificulta cada vez más su control por medio de los tratamientos convencionales (López-Cuevas y col., 2009). La aparición de serotipos resistentes a múltiples antibióticos está teniendo un gran impacto en la eficacia del tratamiento con antibióticos, lo que puede ocasionar un aumento en las tasas de mortalidad por infecciones con *Salmonella*. Estudios epidemiológicos indican que las cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos son más virulentas que las cepas susceptibles, lo cual se refleja en pacientes infectados con cepas resistentes a múltiples antibióticos que presentan enfermedades más severas y más prolongadas (Eng y col., 2015).

Ambas enfermedades generalmente son causadas por consumo de agua o alimentos crudos o mal cocidos contaminados con la bacteria viable, o por contacto con animales infectados con la bacteria; afecta principalmente a personas susceptibles, como niños, ancianos y personas inmunocomprometidas (López y col., 2012). En los últimos años se ha observado un incremento en el número de brotes de gastroenteritis por salmonelosis no tifoidea a nivel mundial como resultado de la globalización de la producción y distribución de alimentos (Marchelletta y col., 2015).

S. Typhi y *S. Paratyphi* son agentes causales de fiebre tifoidea en seres humanos, lo cual implica principalmente una infección sistémica, debido a la capacidad invasiva de los serotipos. En un período de incubación de 7 a 28 días pueden causar la muerte bajo condiciones de inmunosupresión u otros padecimientos que comprometen la respuesta inmune del paciente. Incluye síntomas como fiebre alta (40 °C), cefalea y diarrea en los últimos días (Jurado y col., 2010).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad producida por los demás serotipos de *Salmonella* se conocen como salmonelosis no tifoidea. La gastroenteritis es la forma más común de la enfermedad y los síntomas aparecen en general de 6 a 48 h después del consumo de agua o alimentos contaminados con la bacteria viable. El cuadro clínico de la salmonelosis se limita principalmente al intestino delgado, y causa gastroenteritis o enterocolitis, ocasionada principalmente por *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. La salmonelosis

puede incluir diarrea con varias deposiciones blandas con sangre, diarreas fulminantes y sanguinolentas, cefalalgia, dolor abdominal, náuseas, vómitos, fiebre (38–39 °C) y deshidratación, que generalmente desaparecen después de 3 a 5 días (Jurado y col., 2010). Las defunciones por esta causa son poco comunes; sin embargo, la morbilidad y los costos provocados por la infección por *Salmonella* suelen ser altos (López y col., 2012).

En las infecciones por *Salmonella* también se puede presentar un estado de portador crónico asintomático en el 1 % de los adultos infectados y alrededor de 5 % de los niños menores de 5 años. Estas personas pueden diseminar a la bacteria en el medio ambiente a través de las heces durante cuatro a cinco semanas, e incluso, hasta un año después de la infección, sobre todo si fueron tratados con antibióticos, y pueden transmitir el patógeno por contaminación de agua y alimentos durante todo ese período (Khan, 2014).

Las infecciones localizadas se pueden desarrollar en el 5 a 10 % de los pacientes con bacteriemia; siendo los serotipos *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Cholerasuis* los que se aíslan con mayor frecuencia. Las infecciones no intestinales más comunes son endocarditis, arteritis, afectación del sistema nervioso central, neumonía, infecciones osteoarticulares, infecciones del tracto urinario e infecciones de tejidos blandos (Jurado y col., 2010).

H EPIDEMIOLOGÍA

La salmonelosis es un importante problema de salud pública mundial debido a su significativa tasa de morbilidad y mortalidad. Cada año se reportan 16 millones de casos de fiebre tifoidea con 6 millones de decesos, y de 1,000 a 1,500 millones de casos de gastroenteritis, con una mortalidad de 3 millones de decesos en todo el mundo principalmente en países en vías de desarrollo (Khan, 2014).

El reservorio natural de *Salmonella* es el tubo digestivo de aves, cerdos, bovinos, roedores, reptiles, tortugas, perros, gatos y otros animales domésticos y silvestres; siendo los productos de pollo y gallina, como la carne y el huevo los más comúnmente relacionados a casos de salmonelosis (Jurado y col., 2010).

En EUA, cada año se reportan aproximadamente 1 millón de casos de salmonelosis no tifoidea. De éstos, alrededor de 19,000 personas requieren hospitalización y 380 personas mueren; sin embargo, este número puede variar debido a los casos mal diagnosticados o no reportados (CDC, 2014). *Salmonella* es considerada el principal microorganismo transmitido por alimentos seguido de *Campylobacter* (CDC, 2013). Los serotipos mayormente aislados de muestras clínicas humanas en EUA son los serotipos Enteritidis y Typhimurium, con 16.5 % y 13.4 %, respectivamente, seguido de Newport con 11.4 % y Javiana con 6.4 % (CDC, 2013).

En México, las enfermedades gastrointestinales son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, por ello, se les considera un problema de salud pública.

Salmonella es uno de los principales microorganismos responsables de estas enfermedades (Hernández y col., 2011; SINAVE/DGE, 2012). Según datos de la Dirección General de Epidemiología (DGE), en 2013 se reportaron 53,772 casos de fiebre tifoidea en México, y 12,139 casos en el estado de Sinaloa. Además de 80,092 casos a nivel nacional y 2,241 casos de fiebre no tifoidea en el estado de Sinaloa (DGE, 2014). En el año 2000 se reportaron 134 defunciones causadas por infecciones con *Salmonella* no tifoidea. Sin embargo, para el 2010 se observó una tasa de reducción del 60 %, ya que se reportaron 59 defunciones (SINAVE/DGE, 2012). En el año 2010 también se reportaron 32 defunciones por fiebre tifoidea (SINAVE/DGE, 2012a).

La DGE reportó que el año 2013 se presentaron 5'329,815 infecciones intestinales por otros microorganismos o mal definidas a nivel nacional, de las cuales 155,035 correspondieron al estado de Sinaloa (DGE, 2014). No se puede descartar que dentro de este grupo se encuentren infecciones por *Salmonella*; ya que el principal medio de diagnóstico del agente etiológico es por síntomas clínicos y no por identificación microbiológica.

Por otra parte, en México, también se han reportado de manera esporádica casos de salmonelosis asociados con el consumo de alimentos contaminados con *Salmonella*. En el 2001 se reportó un brote de salmonelosis en el que se

presentaron alrededor de 129 casos, siendo *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium los serotipos mayormente detectados (Chávez-De la Peña y col., 2001). En el 2014, reportó un brote de salmonelosis causado por el *S.* Oranienburg, el cual afectó a 152 internos en una prisión del estado de Michoacán (Vazquez-Garcidueñas y col., 2014).

I CICLO INFECCIOSO DE *Salmonella*

El ciclo infeccioso de *Salmonella* comienza cuando el patógeno entra en el hospedero, lugar donde se enfrenta a diversos ambientes que poseen diferentes propiedades químicas y físicas, como temperatura, pH, osmolaridad y disponibilidad de nutrientes. *Salmonella* también confronta varios componentes del sistema inmune, como las barreras anatómicas, sistema de complemento, fagocitosis, etc., por lo que la bacteria debe responder de manera coordinada expresando genes que le provean ventajas para su adaptación (Ohl y Miller, 2001).

Las estrategias de patogenicidad de *Salmonella* incluyen la penetración de la barrera epitelial y la interacción con células del sistema inmune; por lo que, el ciclo infeccioso que realiza puede dividirse en una fase intestinal y una fase sistémica (Khan, 2014). Dichas fases se llevan a cabo a través de una serie de etapas; adherencia, invasión, supervivencia y multiplicación intracelular y daño a la célula hospedera; lo que finalmente lleva a la aparición de la enfermedad.

1 Fase intestinal

Después el consumo de agua o alimentos contaminados con la bacteria, *Salmonella* se enfrenta con el pH ácido del estómago, lo que disminuye el número de bacterias viables para desarrollar la enfermedad (Khan, 2014). Se estima que la dosis infectiva para *Salmonella* es de 10^5 - 10^6 bacterias; sin embargo, cuando la bacteria es ingerida mediante alimentos contaminados la dosis infectiva puede ser menor debido a que el pH del estómago aumenta temporalmente después del consumo de alimentos (Álvarez-Ordoñez y col., 2011). No obstante, *Salmonella* también puede inducir una respuesta de tolerancia al ácido (ATR, siglas en inglés) para mantener el pH intracelular a valores más altos que en el ambiente extracelular; y con ello, lograr la supervivencia de una pequeña subpoblación (Spector y Kenyon, 2012; Fábrega y Vila, 2013). Tras alcanzar el intestino delgado, *Salmonella* se ve expuesta a los efectos destructivos del contenido luminal, como sales biliares, enzimas, péptidos antimicrobianos e inmunoglobulina secretora (IgA secretora) (Khan, 2014). En el lumen intestinal puede seguir diferentes vías de infección: (i) a través de células del epitelio intestinal, (ii) células M, (iii) células dendríticas (DCs), (iv) o por daño a la barrera intestinal (**Fig. 2**) (Jurado y col., 2010; Khan, 2014).

Salmonella entra en contacto con las células del epitelio intestinal, a las que se adhiere y coloniza el epitelio (Fábrega y Vila, 2013). Este tejido está conformado principalmente por células epiteliales no fagocíticas; sin embargo, *Salmonella* es capaz de invadirlas a través de proteínas efectoras inyectadas

directamente al citoplasma de la célula eucariótica (Khan, 2014) o mediante la interacción directa con receptores de membrana de la célula eucariota (Velge y col., 2012). La invasión de *Salmonella* en células M y células epiteliales se efectúa por el lado apical, luego por transcitosis migra hacia el lado basolateral y por exocitosis sale al espacio intersticial de la lámina propia (Velge y col., 2012).

En la mayoría de las personas saludables, *Salmonella* permanece localizada en el tracto gastrointestinal, lo cual provoca la migración de neutrófilos hacia el lumen intestinal, provocando una respuesta inflamatoria. La permeabilidad vascular que conlleva a la inflamación, en combinación con el daño al epitelio intestinal, provocan la diarrea. En la mayoría de los casos la infección se limita al intestino delgado, pero en algunas ocasiones involucra al colon (Khan, 2014).

2 Fase sistémica

Después de cruzar la barrera epitelial, *Salmonella* puede ser fagocitada por células del sistema inmune, en dichas células puede sobrevivir e iniciar una infección sistémica (López y col., 2012). Dentro de la lámina propia, *Salmonella* es fagocitada por diferentes fagocitos; como macrófagos, células dendríticas o neutrófilos, y difunde rápidamente a través de la linfa eferente en los ganglios linfáticos mesentéricos y a través de la circulación de la sangre hacia el bazo y el hígado (**Fig. 2**) (Velge y col., 2012). Dentro de células del sistema inmune, *Salmonella* puede sobrevivir y multiplicarse, activando genes codificados por SPI-2, y con ello manipulando funciones de la célula hospedera mediante la secreción

de proteínas efectoras a través del T3SS; el resultado es la modificación del fagosoma en una SCV (vacuola que contiene “*Salmonella*”, siglas en inglés) (Khan, 2014). Estas células fagocíticas pueden atravesar las barreras tisulares y transportar a la bacteria del tracto gastrointestinal hacia la circulación, produciendo una enfermedad sistémica (López y col., 2012).

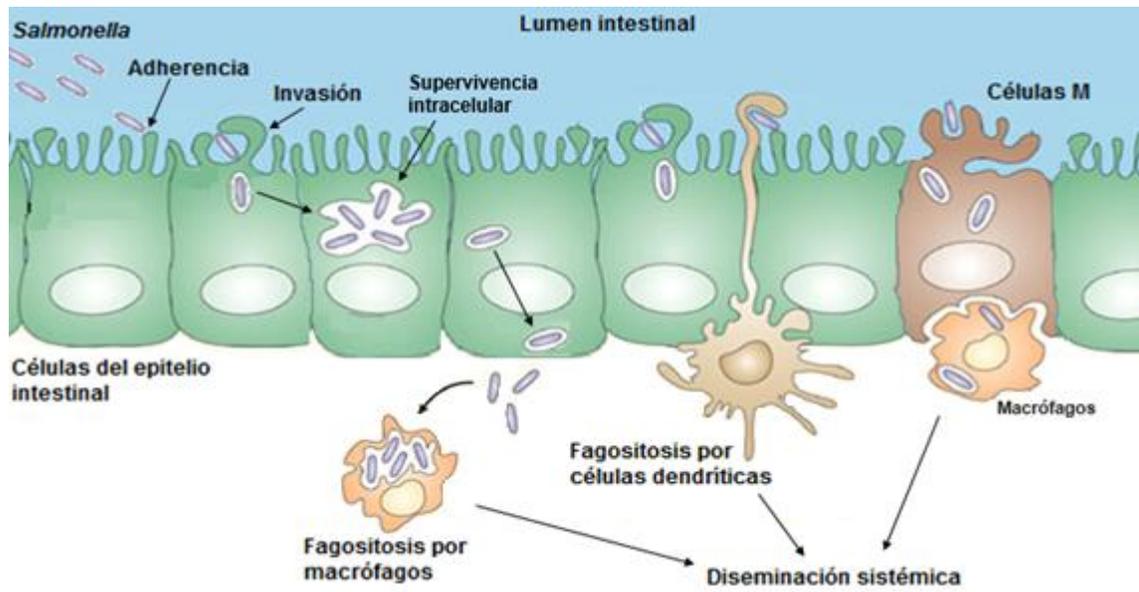


Fig. 2. Ciclo infeccioso de *Salmonella*. El ciclo infeccioso por esta bacteria incluye la penetración de la barrera epitelial y la interacción con células del sistema inmune.

Khan (2014).

J POTENCIAL PATOGENICO

Existen algunos factores críticos para el inicio de una infección por *Salmonella* tales como el serotipo, la dosis infecciosa de alrededor de 10^5 a 10^6 bacterias, o el estado fisiológico del hospedero para el desarrollo de la enfermedad (Humphrey, 2004; Velge y col., 2012). Sin embargo, la bacteria posee diferentes factores de virulencia que promueven su proceso infeccioso. La interacción patógeno-célula hospedera es el resultado de la expresión coordinada de genes de virulencia codificados en SPIs (López y col., 2012; Khan, 2014). Existen aproximadamente 20 SPIs distribuidas alrededor del cromosoma circular de *Salmonella*; además de estas, existe más diversidad genética aportada por plásmidos, islotes, profagos y restos de fagos (Khan, 2014).

Entre las SPIs más estudiadas se encuentra la SPI-1 y la SPI-2, dichas islas, las cuales son grupos de genes, además de codificar proteínas efectoras importantes para la patogenicidad de la bacteria, codifican de 20 a 30 proteínas estructurales que forman T3SS. Estos T3SS permiten a la bacteria inyectar proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedera, a través de una estructura molecular similar a una aguja que posee un translocón, y crea un poro en la membrana de la célula hospedera (Velge y col., 2012; Khan, 2014). *Salmonella* posee dos T3SS codificados por la SPI-1 y SPI-2; el T3SS codificado por la SPI-1 (T3SS-1) está implicado en la fase intestinal de la enfermedad, debido a que promueve la internalización de la bacteria en células que no son fagocíticas, mientras que el T3SS codificado por la SPI-2 (T3SS-2) es esencial

para la fase sistémica, debido a que permite la supervivencia y multiplicación intracelular de la bacteria en diferentes células eucariotas (Moest y Méresse, 2013; Khan, 2014).

La regulación de los genes que se encuentran dentro de SPI es compleja; el oxígeno, pH, osmolaridad y la fase de crecimiento en la que se encuentra la bacteria, pueden alterar la expresión de genes de virulencia (Altier y col., 2000). Cuando *Salmonella* llega al epitelio intestinal, factores como la elevada osmolaridad promueve la activación de *hilD*, el cual induce la expresión del gen regulador *hilA*, este a su vez, regula la activación de los genes codificados por la SPI-1, necesarios para el ensamble del T3SS-1. Una vez que *Salmonella* se encuentra dentro de la célula hospedera, se enfrenta con una baja osmolaridad, baja concentración de Ca^{+2} y un pH ácido; estos factores activan sistemas de dos componentes, *Envz/Ompr* y *SsrAB*, los cuales activan genes de la SPI-2 necesarios para su supervivencia intracelular (Dandekar y col., 2015).

1 Adherencia

Un paso crucial en la infección de *Salmonella* es la adherencia de la bacteria a células del epitelio intestinal, lo que permite su colonización (Fábrega y Vila, 2013). La adherencia se lleva a cabo a través de adhesinas que se encuentran en la membrana celular de la bacteria, como fimbrias y lipopolisacáridos, que le permiten reconocer específicamente a receptores de las células hospederas, lo cual determina la especificidad de hospedero de ciertos serotipos de *Salmonella*

(López y col., 2012). Para *S. Typhimurium* se conocen al menos 13 adhesinas fimbriales y 3 no fimbriales, además 6 **SPIs** están involucradas en el proceso de adherencia de esta bacteria (López y col., 2012). Dostal y col. (2014) estudiaron la capacidad de adherencia de *S. Typhimurium*, la cual fue previamente aislada de un paciente sintomático; ellos utilizaron un co-cultivo de las líneas celulares epiteliales humanas Caco-2 y HT29, y reportaron una capacidad de adherencia de 29 %. Gagnon y col. (2013) obtuvieron 10.3 % y 6.7 % de adherencia de dos cepas *S. Typhimurium* aisladas de muestras clínicas en células Caco-2. Por otra parte, en el 2011 se realizó un estudio de la capacidad de adherencia de la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC 14028 utilizando también la línea celular epitelial humana Caco-2, encontrando 6.3 % de adherencia (Sirsat y col., 2011). Estos estudios muestran un panorama de la capacidad de adherencia por parte de cepas provenientes de un hospedero y cepas de referencia.

2 Invasión

Una vez que la bacteria se ha adherido, el siguiente paso en el proceso infeccioso es la invasión de células del epitelio intestinal. Este proceso de invasión requiere de la activa participación de la bacteria, debido a la expresión de numerosos genes de virulencia codificados principalmente por la **SPI-1** (Altier, 2005; López y col., 2012). *Salmonella* produce su internalización en células que normalmente son no fagocíticas como células del epitelio intestinal, mediante dos mecanismos que se diferencian de acuerdo a criterios morfológicos basados en

la remodelación de la membrana (**Fig. 3**) (Velge y col., 2012). El mecanismo dependiente de T3SS-1 o también llamado “trigger”, implica reordenamientos dramáticos del citoesqueleto que forman ondulaciones de la membrana de la célula eucariota. Por otra parte, durante el mecanismo independiente de T3SS-1, también llamado “zipper” o “entrada mediada por receptor”, solo se llevan a cabo reordenamientos menores del citoesqueleto, produciendo inmersiones de la membrana; sin embargo, en ambos mecanismos, la bacteria secuestra procesos fisiológicos de la célula hospedera a través de la modulación de la transducción de señales (cascadas de señalización celular) (Velge y col., 2012).

En el lumen intestinal, estimulada por el ambiente (pH, osmolaridad, entre otros), *Salmonella* expresa genes para T3SS-1, posteriormente el T3SS-1 es ensamblado en la membrana (Velge y col., 2012). Al encontrarse en contacto cercano con las células epiteliales, *Salmonella* utiliza el T3SS -1 para secretar e introducir proteínas directamente al citosol de la célula hospedera. Estas proteínas reorganizan y polimerizan el citoesqueleto de actina de dicha célula, provocando ondulaciones de la membrana celular, después de 10 a 30 min del contacto, y con ello, la internalización de la bacteria (**Fig. 3B**); después de 2 a 3 h el proceso es revertido, mostrando un citoesqueleto normal a pesar de la presencia de un gran número de bacterias intracelulares (Velge y col., 2012; Moest y Méresse, 2013). Por otra parte, *Salmonella* posee proteínas de membrana externa (OMPs, por sus siglas en inglés), las cuales actúan como invasinas. Las OMPs interactúan con receptores específicos de la célula

hospedera y activan cascadas de señalización que promueven ligeros reordenamientos del citoesqueleto de actina, provocando inmersiones de la membrana en el lugar de entrada de la bacteria (**Fig. 3A**) (Velge y col., 2012). *Salmonella* termina protegida la SCV dentro de la célula hospedera (López y col., 2012). Nesse y col. (2011) estudiaron el efecto de moléculas de señalización implicadas en *quorum sensing* sobre la invasión de *S. Typhimurium* en líneas celulares HEp-2. Estos investigadores reportaron un aumento en el índice de invasión en presencia de dichas moléculas. Por lo que, *Salmonella* es capaz de responder a factores dentro del hospedero que promueven su capacidad invasiva. Asimismo, Sirsat y col. (2011) realizaron un estudio sobre la capacidad invasiva de la cepa de referencia *S. Typhimurium* ATCC 14028 utilizando la línea celular humana de linaje epitelial Caco-2, reportando 0.06 % de invasión. Sin embargo, Dostal y col. (2014) obtuvieron 2.1 % en la capacidad invasiva de *S. Typhimurium* aislada de un paciente en un co-cultivo de células Caco-2 y HT29; mientras que, Gagnon y col. (2013) obtuvieron 7.1 % y 6.4 % de invasión de dos cepas de *Typhimurium* aisladas de muestras clínicas, utilizando también células Caco-2. De acuerdo a todas las investigaciones mencionadas, los serotipos provenientes de un hospedero se encuentran mejor adaptado para llevar a cabo un proceso infeccioso.

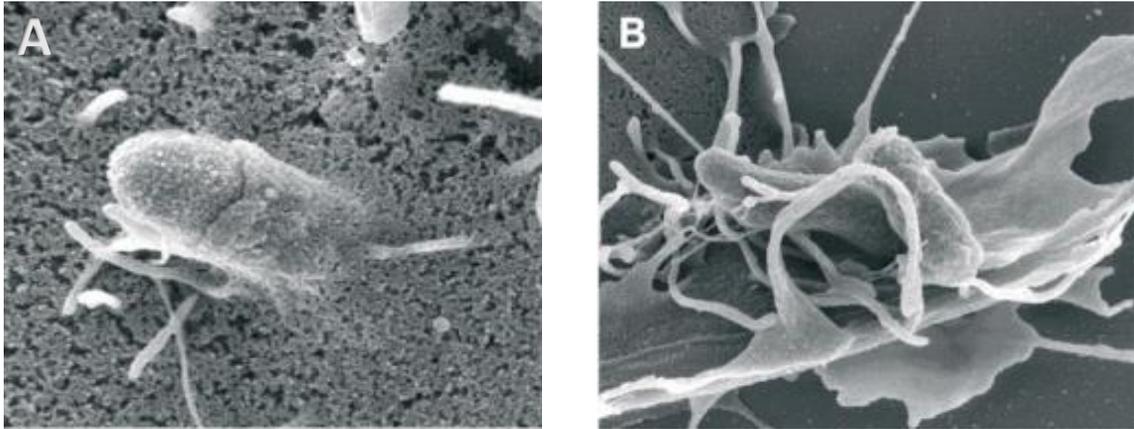


Fig. 3. Invasión celular por *Salmonella*. A) Fotomicrografía electrónica de barrido de la entrada de *Salmonella* por el mecanismo independiente de T3SS o “endocitosis mediada por receptor”, caracterizada por pequeñas inmersiones de la membrana. B) Fotomicrografía electrónica de barrido de la entrada de *Salmonella* por el mecanismo “dependiente de T3SS-1”, el cual se caracteriza por la aparición de ondulaciones de la membrana en el sitio de entrada de la bacteria.

Velge y col., (2012).

3 Supervivencia intracelular

Después de la invasión, *Salmonella* queda dentro de la SCV, la cual está formada por membrana de la célula hospedera (Eng y col., 2015). En condiciones normales, la presencia de la bacteria puede desencadenar una respuesta inmunológica de la célula hospedera, resultando en la fusión del fagolisosoma y posterior degradación lisosomal. Sin embargo, *Salmonella* es capaz de modificar la SCV, usando el T3SS para introducir proteínas efectoras dentro de la SCV, que alteran a la vacuola y bloquea su fusión con los lisosomas, lo que permite la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria (Dandekar y col., 2012; Eng y col., 2015).

Para poder sobrevivir y multiplicarse intracelularmente, *Salmonella* debe activar mecanismos de virulencia que involucran la resistencia y evasión de estos efectores antimicrobianos. Uno de estos mecanismos es el T3SS codificado por la SPI-2, el cual se utiliza para secretar proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedera a través de la membrana de la SCV (Khan, 2014). Inicialmente, la SCV adquiere marcadores de endosoma temprano (Rab5), los cuales son remplazados por marcadores de endosoma tardío (Rab7) y lisosoma (Lamp1). Sin embargo, la SCV no se fusiona directamente con los lisosomas y evita la degradación de *Salmonella* (Velge y col., 2012). La bacteria también modifica el tráfico vesicular de la célula hospedera, lo que permite dirigir importantes metabolitos hacia la SCV y proporciona un nicho de multiplicación seguro (Khan, 2014). La SCV se localiza en una región perinuclear donde son incorporados los

nutrientes necesarios para que la multiplicación inicie. Para obtener estos nutrientes, *Salmonella* utiliza estructuras filamentosas llamadas Sifs, las cuales son extensiones tubo vesiculares ricas en proteínas lisosomales; producidas por la fusión de la SCV con los endosomas tardíos (López y col., 2012). El inicio de la multiplicación intracelular comienza entre las 4 y 6 h del comienzo de la infección (Dandekar y col., 2015).

Además, las actividades antimicrobianas de macrófagos incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, péptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *S. Typhimurium* resiste a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la SCV, mediante biosíntesis de nutrientes dentro de la célula hospedera y reparación de DNA (Bowden y col., 2010).

Libby y col. (2000) realizaron un estudio de la invasión de *S. Typhimurium* en macrófagos derivados de monocitos purificados de sangre humana. La cuantificación bacteriana intracelular mostró un aumento en el número de bacterias viables después de 24 h post infección, lo que demostró que *S. Typhimurium* fue capaz de sobrevivir a la actividad fagocítica de macrófagos humanos.

Otro estudio sobre la supervivencia intracelular de *Salmonella*, utilizando los serotipos Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Hadar, Pullorum y Gallinarum en células epiteliales CKC y macrófagos HD11 después de 2, 6, 24 y 48 h de infección, se encontró que los serotipos Pullorum y Gallinarum, asociados principalmente a enfermedades en aves, mostraron menor capacidad de

supervivencia en todos los tiempos de infección, tanto en células epiteliales como en macrófagos, en comparación a los principales serotipos causantes de enfermedades en humanos, esto a pesar que las líneas celulares utilizadas son provenientes de aves. En general la supervivencia en células epiteliales permanece constante en todos los puntos de infección, mientras que en macrófagos comienza a disminuir después de las 6 h de infección (Setta y col., 2012).

4 Daño celular

Las proteínas efectoras secretadas por el **T3SS** pueden producir un efecto citotóxico que induce a la célula hospedera una muerte programada mediante diferentes mecanismos (Lamkanfi y Dixit, 2010). *Salmonella* ocasiona la muerte de células epiteliales por apoptosis, inducida por secreción de proteínas efectoras, que pueden producir la despolimerización del citoesqueleto de actina (Fábrega y Vila, 2013). En dicha muerte celular, la célula mantiene la integridad de la membrana plasmática, hay contracción del tamaño celular, condensación y fragmentación nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos, que pueden ser fagocitados por células vecinas o fagocitos residentes (**Fig. 4A**) (Lamkanfi y Dixit, 2010; Fábrega y Vila, 2013). Como consecuencia, la apoptosis no produce inflamación debido a que el contenido celular no es liberado al espacio extracelular (Lamkanfi y Dixit, 2010; López y col., 2012; Fábrega y Vila, 2013).

Salmonella produce apoptosis en células epiteliales después de una prolongada exposición, al menos 12 h después una infección *in vitro* (Fábrega y Vila, 2013).

Por otra parte, *Salmonella* también puede producir muerte celular en macrófagos o células dendríticas mediante un proceso llamado piroptosis (Lamkanfi y Dixit, 2010; Fábrega y Vila, 2013). En esta muerte celular se observa fragmentación de la membrana y liberación del contenido celular, incluyendo citocinas proinflamatorias que evocan inflamación (**Fig. 4B**) (Lamkanfi y Dixit, 2010).

Este efecto citotóxico promueve la diseminación sistémica de las bacterias, debido a que, los macrófagos pueden fagocitar células infectadas que murieron previamente o bacterias liberadas por esas células al espacio extracelular. Los efectos citotóxicos pueden aparecer rápidamente después de la fagocitosis o pueden aparecer después de varias horas (Fábrega y Vila, 2013). Después de 18 a 24 h de infección, el citoesqueleto de actina es despolimerizado por las proteínas efectoras secretadas por la bacteria, aparece el desprendimiento de las células y por último muerte por piroptosis (Browne y col., 2002; Fábrega y Vila, 2013).

En un estudio sobre la viabilidad de macrófagos derivados de monocitos purificados de sangre periférica humana, después de ser infectados con *S. Typhimurium*, se observó un desprendimiento del 36 % de los macrófagos de la botella de cultivo después de 24 h de infección. Al observar la morfología de las células se encontraron macrófagos con morfología típica, pero contenían

numerosas bacterias intracelulares, macrófagos con una extensa vacuolización y macrófagos con una infección bacteriana masiva y desintegración nuclear. Después de las 24 h de infección la viabilidad se redujo 40 %, por lo que estos investigadores demostraron que *S. Typhimurium* además de ser capaz de multiplicarse dentro de macrófagos, así como también es capaz de causarle daño (Libby y col., 2000).

En otro estudio se determinó el porcentaje de viabilidad de la línea celular epitelial CKC y la línea celular de macrófagos HD11 previamente infectadas con *S. Enteritidis* y *S. Pullorum*, encontrando una viabilidad de 78.8 y 77.5 % después de 24 h de infección y de 49.5 y 48.0 % después de 48 h de infección, respectivamente (Setta y col., 2012).

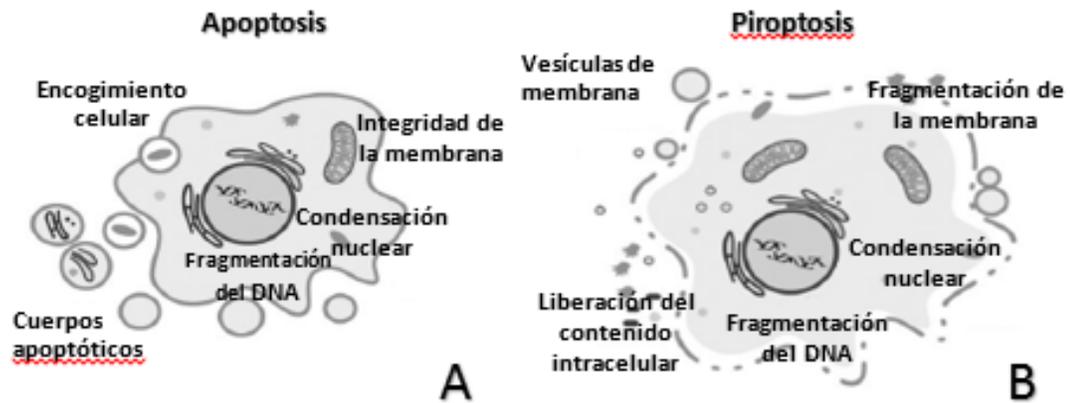


Fig. 4. Muerte celular programada por la infección con *Salmonella*. A) Apoptosis: la célula mantiene la integridad de la membrana plasmática, hay contracción del tamaño celular, condensación y fragmentación nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos. B) Piroptosis: se observa fragmentación de la membrana celular y liberación del contenido intracelular, incluyendo citocinas proinflamatorias que provocan inflamación.

Lamkanfi y Dixit (2010).

K DIVERSIDAD GENÓMICA

Hace aproximadamente 150 millones de años, *Salmonella* evolucionó de un antepasado en común con *Escherichia coli* (Doolittle y col., 1996). Durante el proceso evolutivo, la mutación, así como la adquisición o pérdida de genes son eventos claves que podrían haber llevado a las bacterias a divergir (Wang y col., 2015), y por lo que son considerados los principales sucesos en la evolución de la virulencia de *Salmonella* (Porwollik y McClelland, 2003).

Como lo describen Wang y col. (2015), se ha postulado que la evolución de la virulencia de *Salmonella* ocurrió en tres etapas, la primera comprende la división de *Salmonella* y *E. coli* por la adquisición de SPI-1, la cual está ausente en *E. coli*, pero está presente en todos los linajes de *Salmonella* y les permite invadir células no fagocíticas del epitelio intestinal. La segunda etapa es la adquisición de la SPI-2, dividiendo a *Salmonella* en dos especies, *enterica* y *bongori*, y permitiendo a la especie *enterica* sobrevivir dentro de macrófagos. Finalmente, en la tercera etapa el subgrupo I se adaptó al ambiente en animales de sangre caliente. Sin embargo, los principales eventos genómicos involucrados siguen siendo desconocidos.

La secuenciación del genoma bacteriano comenzó hace 20 años. Durante este período, la combinación de la secuenciación del genoma y análisis de las secuencias utilizando herramientas de bioinformática ha transformado nuestra comprensión de la biología, diversidad y evolución de las bacterias, su interacción con otras bacterias, con sus hospederos y el ambiente que las rodea, así como

también el papel que desempeñan en procesos importantes como es la patogenicidad (Loman y Pallen, 2015).

En los últimos años se han aplicado varios enfoques para elucidar la estructura de la población de *Salmonella*, como el estudio del contenido genético basándose en técnicas como la secuenciación. En el 2001 se reportó la secuenciación del genoma completo de la cepa patogénica y resistente a antibióticos *S. Typhi* CT18 (Parkhill y col., 2001), su genoma de 4.86 Mb contiene más de 200 pseudogenes, algunos de los cuales son genes de virulencia en *S. Typhimurium*. Por otro lado, en ese mismo año, también se reportó la secuenciación del genoma completo de

Salmonella enterica serovar *Typhimurium* LT2 (4.81 Mb), la cual causa gastroenteritis y es frecuentemente utilizada como modelo murino para el estudio de la fiebre tifoidea y contiene un plásmido de virulencia de 94 Kb (McClelland y col., 2001). *S. Typhi* contiene en su genoma alrededor de 4,000 genes, pero más de 200 permanecen funcionalmente inactivos, mientras que en *S. Typhimurium* los homólogos para estos genes son totalmente funcionales. Las diferencias entre el contenido genético entre ambas cepas patogénicas pueden explicar, diferencias fenotípicas entre ellas, como la restricción a hospederos humanos por parte de *S. Typhi*, entre otras más diferencias (Weitzman, 2001).

De esta manera, la secuencia de estas cepas ampliamente estudiadas, pueden usarse para genómica comparativa, comparando estos genomas con el de otras cepas de *Salmonella* o con genomas de otros microorganismos

evolutivamente relacionados como *E. coli*, lo que permite identificar genes relacionados con especificidad de hospedero y patogenicidad (Weitzman, 2001).

Investigadores han utilizado genómica comparativa para estudiar las diferencias poblacionales en *S. enterica* subsp. *enterica* y determinar las diferencias en su contenido genético asociado con su divergencia ecológica y patogénica (den Bakker y col. 2011). Mediante secuenciación anotaron el genoma de 16 cepas de diferentes serotipos de *Salmonella* y reportaron evidencia de que *S. enterica* subsp. *enterica* representa dos clados evolutivos con distintas características genómicas, incluyendo diferentes genes de virulencia, lo que sugiere que las características de transmisión y la ecología son distintas entre estos grupos. Dado que los serotipos de *Salmonella* que representan uno de los grupos (clado A) son los más comúnmente estudiados (Enteritidis, Typhimurium, Newport), estos investigadores siguieron futuros estudios de patogénesis y virulencia en el otro grupo (clado B) que incluye serotipos como Pomona, Give, Sandiego, entre otros serotipos menos estudiados.

L MECANISMOS MOLECULARES DE PATOGENICIDAD

La interacción de cada uno de los serotipos de *Salmonella* con su hospedero es cada día más comprendida, con el avance del estudio de los mecanismos moleculares de patogenicidad a través de técnicas como la secuenciación del ADN, entre muchas otras.

Para desencadenar una enfermedad, *Salmonella* debe encontrarse en un ambiente adecuado para su establecimiento y expresión de genes de virulencia. Sin embargo, *Salmonella* debe resistir o evadir diversos mecanismos de defensa al entrar a un nuevo hospedero por vía oral. Al entrar a un nuevo hospedero a través del consumo de alimentos o agua contaminada, la bacteria se enfrenta al pH ácido del estómago, una vez en los intestinos, debe lidiar con la limitación de oxígeno, sales biliares, péptidos antimicrobianos, mayor osmolaridad, además de la competencia con la flora microbiana y microorganismos residentes por nutrientes y espacio. Después de promover su propia invasión, termina dentro de la SCV en un ambiente carente de nutrientes. Al ser fagocitados por macrófagos se enfrentan a la acidificación, oxígeno reactivo y limitación de nutrientes dentro del fagosoma (Figueroa y Verdugo, 2005; Spector y Kenyon, y col., 2012). Para sobrevivir y desencadenar el proceso infeccioso *Salmonella* debe responder a esos factores de estrés modulando su expresión de genes que codifican factores de virulencia (Figueroa y Verdugo, 2005; Fábrega y Vila, 2013).

1 Adhesinas

La secuenciación del genoma de la cepa patogénica *S. Typhimurium* LT2 ha revelado la existencia de 13 fimbrias (McClelland y col., 2001). Las fimbrias tipo 1 y las fimbrias curli codificadas en operones son los únicos que han logrado expresar *in vitro* en condiciones normales de laboratorio (Humphries y col., 2003). Las fimbrias han sido implicadas en varios procesos, como adherencia a células

epiteliales (fimbrias tipo 1, curli, Pef, Lpf y std); persistencia intestinal (fimbrias Lpf, Bcf, stb, stc, std, sth) y formación de biofilm (fimbria curli) (Fabrega y Vila, 2013).

Las fimbrias tipo 1 son codificadas por los genes *fim*, los cuales se encuentran en un grupo de genes, que incluyen el operon de seis genes *fimAICDHF* que codifican subunidades estructurales, y los tres genes reguladores *fimZ*, *fimY* y *fimW*. La fimbria tipo 1 se une a la matriz extracelular y media la adherencia a un amplio rango de células eucariotas (Fábrega y Vila, 2013). Los genes de codifican la fimbria curli, también llamada tafi, o fimbria agregativa delgada, se encuentran en los dos operones *csgBAC* y *csgDEFG*. En contraste con otras fimbrias, codificadas por operones, las fimbrias *pef* se encuentran codificadas en el plásmido de virulencia *pSLT*. Otras proteínas no fimbriales implicadas en la adherencia de la bacteria son *siiE*, *bapA*, *misL*, *siiC*, *siiD*, *siiF*, *siiA* y *siiB* (Fábrega y Vila, 2013).

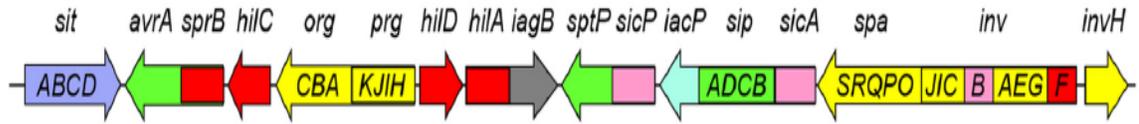
2 Islas de Patogenicidad de *Salmonella*

La mayoría de los factores de virulencia de *Salmonella* están codificados en grupos de genes llamados islas de patogenicidad de *Salmonella* (**SPIs**). Se han identificado varias **SPIs** involucradas en la patogenicidad de *Salmonella*, sin embargo, la **SPI-1** y **SPI-2** son las más estudiadas (**Fig. 5**). La **SPI-1** contiene varios genes que codifican para proteínas efectoras que en su mayoría desencadenan el proceso de invasión en células epiteliales no fagocíticas,

provocando reordenamientos del citoesqueleto de actina, para internalizar a la bacteria. Esta **SPI-1** también codifica genes que forman el **T3SS**. Además, esta isla contiene los operones *prg/org* e *inv/spa* que codifican el complejo aguja, el operon *sic/sip* que codifica proteínas efectoras y el traslocon (*sipBCD*), y varias proteínas chaperonas (Fábrega y Vila, 2013).

Por otro parte, la **SPI-2** está implicada principalmente en la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir y replicarse en la **SCV** dentro de células epiteliales y macrófagos. Contiene los genes *ssa* que codifican su propio **T3SS**, el operon *sseBCD* que forma el traslocón, los genes reguladores **SSR**, las chaperonas *ssc* y los genes *sse* que codifican para proteínas efectoras (Fabrega y Vila, 2013).

SPI-1



SPI-2

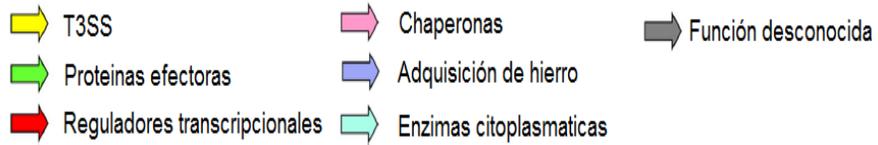


Fig. 5. Representación esquemática de los genes dentro de las SPI I y II.

Fábrega y Vila (2013).

3 Sistema de secreción de tipo III

Los **T3SS-1** y **T3SS-2** juegan papeles importantes durante la patogénesis de la *Salmonella*. El **T3SS-1** facilita la invasión de la bacteria en células no fagocíticas por lo que ayuda en la fase intestinal de la infección, mientras que el **T3SS-2** es requerido para la supervivencia y replicación dentro de diferentes células eucariotas durante la fase sistémica de la infección (Moest y Meresse, 2013). Los **T3SSs** son organelos macromoleculares compuestos de un cuerpo basal que se expande a través de la membrana celular y el complejo aguja que se extiende fuera de la membrana, a través del cual las proteínas efectoras son secretadas dentro de la célula hospedera o fuera de la **SCV**. El cuerpo basal consiste en un anillo interno (constituido por 24 subunidades de los genes *prgH* y *prgK*), un cuello que atraviesa la zona periplásmica y un anillo externo (constituido por 15 copias del gene *invG*). La aguja está compuesta de copias del gen *prgI* y el gen *sipD*. También se requiere de un complejo regulador citosólico que está unido al cuerpo basal, una barra interna formada por *prgJ* que constituye la base de la aguja, y un translocón, que forma un poro en la membrana de la célula hospedera y está constituido por las proteínas *sipB* y *sipC* (**Fig. 6**) (Moest y Meresse, 2013).

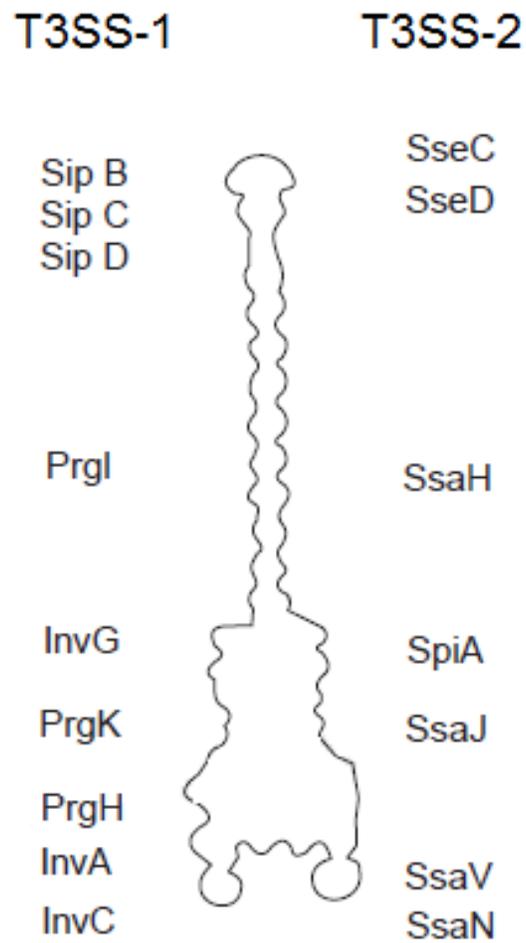


Fig. 6. Representación esquemática del T3SS-1 y T3SS-2 y sus proteínas estructurales.

Moest y Meresse (2013).

4 Plásmidos y profagos

A través de transferencia de genes las bacterias pueden intercambiar información contenida en moléculas de ADN como fagos integrados o plásmidos; y proporcionan a las bacterias la oportunidad de recibir genes relacionados con virulencia o resistencia a antimicrobianos (de Jong y col., 2012). Entre el elevado número de serotipos de *Salmonella*, sólo unos cuantos albergan un plásmido de virulencia pSLT, por ejemplo, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Choleraesuis* y *S. Dublin*. Este plásmido alberga los genes spvRABCD, el gen spvR es un gen regulador; los genes spvB y spvC son las únicas proteínas efectoras con función conocida, el gen spvB que es necesario para la supervivencia dentro de macrófagos, y el gen spvC está involucrado en la fase pro inflamatoria de la enfermedad (Lesnick y col., 2001; Fábrega y Vila, 2013). Por el contrario, el gen spvA, que se encuentra exclusivamente en la membrana externa, y el gen spvD que es exportado fuera de la célula, desempeñan papeles en la virulencia de *Salmonella* que aún no se han dilucidado (Fábrega y Vila, 2013). Los profagos pueden transferir genes implicados en la virulencia bacteriana incluyendo varios efectores del sistema de secreción tipo III, los cuales juegan un papel importante en la virulencia de *Salmonella* (de Jong y col., 2012).

5 Regulación de la expresión de factores de virulencia

La regulación de la expresión de genes juega un papel importante en la eficiencia de la patogenicidad de *Salmonella*, coordinando la correcta expresión

de los factores de virulencia. La regulación de los genes codificados en la SPI-1 es extremadamente compleja y depende de la acción de reguladores que se encuentran dentro y fuera de la isla. Estos reguladores detectan el mejor ambiente para la invasión, para después activar la expresión de los genes de la SPI-1 y comenzar con el proceso de patogénesis. Se ha descrito que niveles bajos de oxígeno y una alta osmolaridad activan estos genes durante ensayos *in vitro* (Bajaj y col., 1996). Mientras que los genes de la SPI-2 son expresados cuando la bacteria se encuentra en un ambiente ácido con bajos niveles de osmolaridad y calcio (Garmendia y col., 2003).

El gen *hilA* es un activador transcripcional que pertenece a la familia OmpR/ToxR, es codificado dentro de la SPI-1 y se puede autorregular negativamente, juega un papel central en el proceso de invasión. Esto debido a que activa los operones que forman el T3SS-1. *hilA* se une a los promotores y activa los operones *prg/org* y *inv/spa*, mientras que el operón *sic/sip* es activado por *invF* (Fábrega Y Vila, 2013). Se ha demostrado que la supresión del regulador *hilA* provoca que no se expresen ninguno de los genes dentro de la SPI-1 (Ellermeier y col., 2005). El gen *hilA* también activa algunas proteínas efectoras que son secretadas por T3SS-1 (Thijs y col., 2007). Por otro lado, cuando *Salmonella* se encuentra en condiciones adecuadas para desarrollar el proceso de invasión, el gen *hilA* reprime la expresión de los genes pertenecientes a la SPI-2 (Fábrega y Vila, 2013). El regulador *invF* se encuentra dentro de SPI-1, en el operón *inv*, el cual puede ser activado de manera dependiente o independiente

de hilA. Este regulador actúa junto a la chaperona sicA para activar genes que codifican proteínas efectoras, en su mayoría dentro de la SPI-1 en el operón sic/sip, pero también en otras partes del cromosoma, como es el operón sigDE (Darwin y Miller, 2000). La expresión de hilA es controlada por tres activadores transcripcionales; rtsA, hilC y hilD, los dos últimos codificados dentro de la SPI-1. Estos activadores se unen al promotor de hilA y promueven su expresión. Los tres activadores pueden promover la expresión de invF, uniéndose a su promotor. Rtsa también puede activar a los genes efectoras slrP y dsbA. Además, hilD también puede inducir la expresión de genes dentro de la SPI-2 uniéndose al promotor del operón ssrAB (Fábrega y Vila, 2013). El gen regulador hilE es el más importante regulador negativo de hilA, se encuentra codificado fuera de la SPI-1. La sobreexpresión de hilE suprime la transcripción de hilA (Baxter y col., 2003).

Dentro de los reguladores de los genes de la SPI-2 más importantes, se encuentra el sistema de regulación de dos componentes ssrA-ssrB, codificado dentro de la SPI-2. Este sistema de regulación también es necesario para activar la expresión de proteínas efectoras secretadas a través del T3SS-2, sifA y sifB (Garmendia y col., 2003). Para la regulación de adhesinas, marT induce la expresión de la adhesina misL uniéndose directamente a su promotor (Tukel y col., 2007).

Los genes *fimWYZ* constituyen el complejo de activación de la fimbria tipo 1; *fimZ* y *fimY* actúan juntos para activar los genes fimbriales, por otro lado, *fimW* regula de manera negativa a los genes *fim* (Fábrega y Vila, 2013).

Los sistemas de regulación de dos componentes son usados por los microorganismos para percibir cambios en el medio ambiente en el que se encuentran, y responder a ellos mediante la expresión de diferentes genes. Por ejemplo, bajas concentraciones de cationes extracelulares, como las encontradas dentro de la SCV, y un pH bajo se ha reportado que activan el sensor *phoQ*, el cual activa al regulador *phoP*. El regulador *phoP* reprime *hilA* y los genes *prg*, pero activa la transcripción de genes *pag*, que son requeridos para la supervivencia intracelular de la bacteria en macrófagos (Fábrega y Vila, 2013). Otro sistema de regulación de dos componentes es *envZ-ompR*, en donde *envZ* es un sensor que responde a la osmolaridad extracelular y activa *ompR*, el cual es un regulador transcripcional de *hilD* (Ellermeier y col., 2005).

Las proteínas asociadas a nucleótidos (NAP, por sus siglas en inglés), poseen una actividad de unión al ADN y una capacidad de alterar la topología del ADN. En consecuencia, estas proteínas modifican el superenrollamiento del ADN, y con ello pueden modificar la expresión de muchos genes. H-NS se ha observado como represor de la expresión de *hilA* y *rtsA*, mediante la unión directa con su promotor (Olekhnovich y Kadner, 2007). H-NS también reprime la expresión de genes de SPI-2, *ssaB*, *ssaG*, *ssaM* y *sseA*, la adhesina *misL* perteneciente a la SPI-3, el gene *siiE* de SPI-4, y los genes codificados en

plasmidos spvR y spvB (Fábrega y Vila, 2013). La NAP YdgT es un regulador negativo de los genes de la SPI-2. La delección de este gen provoca que la bacteria sobreviva dentro de macrófagos, seguido de una disminución de la supervivencia. La pronta expresión de los genes de la SPI-2 puede parecer ventajosa, sin embargo, esta proteína es necesaria para la virulencia de la bacteria durante la colonización sistémica, ya que se ha observado una expresión moderada de YdtG y una disminución de la expresión de los genes de la SPI-2 en las fases tardías de la infección (Coombes y col., 2005; Fábrega y Vila, 2013).

M ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA DE *Salmonella* EN AMBIENTES ESTRESANTES

Los serotipos de *Salmonella* son capaces de crecer y sobrevivir en diversos ambientes dentro y fuera del hospedero, donde son capaces de responder a gran variedad de factores ambientales. Estos factores ambientales pueden producir estrés en la bacteria debido a la limitación de nutrientes, variaciones en el pH, la temperatura, la osmolaridad, entre otras variables. La respuesta generada a un estrés particular puede proporcionar una resistencia específica al estrés o una resistencia cruzada más general a una variedad de condiciones estresantes (Spector y Kenyon, 2012).

Salmonella está capacitada para adaptarse, crecer y/o sobrevivir en una amplia gama de ambientes estresantes que incluyen: pH extracelulares de 3.99

hasta 9.50, concentraciones de sal de hasta 4 % wv-1 NaCl y temperaturas tan altas como 54 °C o bajas de hasta 2 °C (D 'Aoust y col., 2001).

Dentro del hospedero, *Salmonella* se enfrenta al pH ácido del estómago. Las bacterias sobrevivientes que ingresan a los intestinos deben lidiar con la reducción de oxígeno, sales biliares, péptidos antimicrobianos, ácidos débiles (productos metabólicos de la flora microbiana residente), aumento en la osmolaridad y competencia con microorganismos residentes por nutrientes y espacio. Posteriormente, después de la fagocitosis por los macrófagos, dentro de fagosoma (SCV) la bacteria se expone a la acidificación, limitación de nutrientes, generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y exposición a varios péptidos antimicrobianos (Spector y Kenyon, 2012). Por otra parte, para prevenir o controlar el crecimiento de *Salmonella* y otras bacterias patógeno en alimentos, se combinan en el proceso de fabricación de diferentes alimentos diversas medidas para controlarlas, como la acidificación, las bajas temperaturas y los aditivos alimentarios, como el NaNO_2 y el H_2O_2 (Muhlig y col. 2014).

1 Estrés oxidativo

En *Salmonella* y en *E. coli*, las dos principales vías de respuesta al estrés oxidativo son a través del regulón OxyR, que responde específicamente a la presencia de H_2O_2 , y del regulón SoxRS, que detecta cambios en el estado redox celular. Aunque algunos genes están bajo el control de ambos regulones, hay una superposición limitada entre las vías OxyR y SoxRS, posiblemente debido a

diferentes tipos de daño oxidativo causado por H₂O₂ y agentes de ciclo redox (Spector y Kenyon, 2012).

2 Estrés a pH Ácido

El estrés por pH ácido es un factor ambiental muy común e importante que enfrentan los serotipos de *Salmonella*. El desarrollo de tolerancia/resistencia a los ácidos en *S. enterica* es muy complejo y está muy influenciado por la etapa de crecimiento (fase exponencial, fase estacionaria, etc.), la temperatura de crecimiento, el modo de acidificación ambiental (la presencia de ácidos orgánicos o ácidos inorgánicos) o la presencia de ciertos (Álvarez-Ordoñez y col., 2010). La resistencia al pH ácido es especialmente importante para los patógenos transmitidos por los alimentos que deben sobrevivir al pH ácido del estómago, el cual puede llegar hasta un pH 2 en condiciones de ayuno, y posteriormente sobrevivir a la acidificación del fago lisosoma dentro de la célula hospedera. El estrés ácido también se encuentra en muchos alimentos, como los jugos de frutas, o como resultado del uso de ácidos orgánicos débiles o ácidos grasos de cadena corta (volátiles) (ácido acético, ácido cítrico, ácidos propiónicos, etc.) como conservadores en alimentos (Spector y Kenyon, 2012). *Salmonella* es una bacteria neutralófila que ha desarrollado múltiples mecanismos de tolerancia o resistencia para promover su supervivencia durante su exposición a pH normalmente letal (pH 3.0 o 2.5); lo que conoce como mecanismos de **ATR** y de resistencia al ácido (AR, siglas en inglés), respectivamente.

3 Estrés por Inanición

Como resultado de su ciclo de vida, *Salmonella* sufre comúnmente periodos de falta de nutrientes a través de los diferentes ambientes en los que se encuentra, tanto hospedero como no hospedero. Es común que *Salmonella* encuentre inanición por los principales nutrientes como Carbón (C), fosfatos (P) y nitrógeno (N) (Spector y Kenyon, 2012). Cuando *Salmonella* entra en inanición por falta de fuentes de C entra bajo cambios genéticos y fisiológicos conocidos como respuesta al estrés por inanición (**SSR**, siglas en inglés). Durante las horas iniciales de inanición por falta de C, *Salmonella* evita el estrés por inanición regulando la utilización de fuentes de C alternativas y utilizando sistemas de transporte. A medida que continúa la falta de C, comienzan cambios metabólicos más extensos que producen una célula más pequeña, más resistente y fisiológicamente más eficiente, en comparación con bacterias en óptimo crecimiento (Spector y Kenyon, 2012). La activación de la **SSR** provoca una reprogramación global del metabolismo de la bacteria. Incluyendo 1) la producción de sistemas de transporte y utilización de sustratos nuevos o de mayor afinidad para la captación de nutrientes del medio ambiente si están disponibles, 2) la producción de enzimas para la renovación de componentes celulares innecesarios, por ejemplo, ARN y proteínas de los ribosomas, así como lípidos y peptidoglicanos de la envoltura celular, 3) producción de enzimas para un metabolismo más eficiente y completo de fuentes de C (inusuales), 4) producción de proteínas que causan condensación cromosómica para protegerse

de daños, 5) producción de enzimas que modifican la membrana interna, el peptidoglicano y los componentes de la membrana externa, y 6) producción de enzimas para prevenir o reparar el daño celular como resultado de las tensiones ambientales (Spector y Kenyon, 2012).

IV JUSTIFICACIÓN

Salmonella es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos a nivel mundial. En Culiacán, Sinaloa, diversos trabajos han demostrado la presencia de diferentes serotipos NTS en ambientes acuáticos; los cuales no corresponden con los mayormente asociados a enfermedades en seres humanos. La presencia de *Salmonella* en el medio ambiente la somete a estrés que puede influenciar su supervivencia y virulencia. A pesar de esto, brotes epidemiológicos en EUA, sustentan que hortalizas exportadas de México han sido vehículos de infección, e identifican a serotipos NTS presentes en el medio ambiente como responsables. Aunado a ello, el estudio de la patogenicidad de cepas aisladas del ambiente es limitado, debido a que la mayoría de estos estudios se realizan utilizando como modelo a los principales serotipos responsables de enfermedad en seres humanos o animales. Por ello, resulta indispensable intensificar el estudio de microorganismos patógenos en el medio ambiente, para lograr entender las variantes poblacionales de *Salmonella*, en especial en ríos de Culiacán, Sinaloa. Este estudio se realizó utilizando técnicas de epidemiología molecular que permiten definir la biología de los diversos serotipos NTS circulantes en la región, y establecer la importancia del hábitat en la diseminación de este patógeno. Esta información es imprescindible para diseñar estrategias de control por las autoridades sanitarias, que permitan establecer medidas de contención de enfermedades, restauración del ambiente, disminución de impactos sanitarios y de pérdidas económicas colaterales.

V HIPOTESIS

El agua de río en Culiacán, Sinaloa, es fuente de serotipos no tifoideos de *Salmonella* adaptados al medio ambiente que poseen la capacidad de integrar factores de virulencia por lo que pueden ser responsables de patologías en seres humanos.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genómica, potencial patogénico y estrategias de supervivencia de serotipos no tifoideos de *Salmonella* aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la anotación de genomas de serotipos no tifoideos de *Salmonella* aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa.
2. Analizar el potencial patogénico en modelos *in vitro* e *in silico* de serotipos de *Salmonella* aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa.
3. Evaluar las estrategias de supervivencia, por resistencia a temperatura, radicales libres, pH ácido e inanición, de serotipos de *Salmonella* aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A CEPAS BACTERIANAS

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron siete cepas de *Salmonella* no tifoideas de diferentes serotipos incluyendo a Oranienburg, Give, Pomona, Kedougou, Stanley, Sandiengo y Muenchen, las cuales fueron previamente aisladas en ríos de Culiacán Sinaloa, durante el periodo comprendido entre julio de 2008 y junio de 2009 por Jiménez y col., 2014; y forman parte del proyecto “Estudio del perfil fenotípico, genotípico y potencial patogénico de poblaciones dominantes de *Salmonella enterica* aisladas de ríos del Estado de Sinaloa” dirigido por la Dr. Maribel Jiménez Edéza; por lo que han sido previamente evaluadas por el equipo de trabajo. Anteriormente, las cepas fueron secuenciadas como draft genomas de alta calidad, mediante la metodología de Whole Genome Shotgun (WGS) utilizando la plataforma Illumina Miseq (Illumina, EUA), las secuencias se ensamblaron mediante el programa A5-MiSeq (Tritt y col., 2012) y los ensamblajes se alinearon con el programa Mauve (Darling y col., 2010). Utilizando las secuencias obtenidas de WGS, los genomas de las cepas fueron registradas en la base de datos GenBank de NCBI (Centro nacional para la información en biotecnología, por sus siglas en inglés) con el código de bio proyecto PRJNA186035. Los códigos de acceso a NCBI, al igual que la ubicación, temporada y año de aislamiento se muestran en el **cuadro 2**. Adicionalmente, se obtuvieron los tipos de secuencia con la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MLST, siglas en inglés), y la presencia de genes de resistencia a

antimicrobianos en sus secuencias genómicas con el programa “Short Read Sequence Typing 2” (SRST2). Adicionalmente, las cepas fueron serotipadas de acuerdo con el esquema Kauffmann-White, utilizando antisueros comerciales (Statens Serum Institut, Copenhagen, Dinamarca). Los antisueros polivalentes de *Salmonella* O y H se usaron para el diagnóstico presuntivo, y la designación antigénica definitiva se asignó usando antisueros monovalentes; y se confirmó su serotipificación de manera *in silico* con el programa SeqSero.

Para el análisis de este trabajo de tesis, las lecturas de las secuencias se obtuvieron en formato fasta y genbank directamente de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Todas las cepas se mantuvieron almacenadas a 20 °C hasta su posterior análisis fenotípico.

Cuadro 2. Cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa.

Serotipo	ID de cepa	Número de acceso a NCBI	Ubicación de aislamiento	Fecha de aislamiento	Temporada de aislamiento
Give	CFSAN039524	MEKA00000000	Río Culiacán	Octubre 2008	Otoño
Pomona	CFSAN039526	MEKB00000000	Río Culiacán	Agosto 2008	Verano
Stanley	CFSAN039535	MEKE00000000	Río Culiacán	Mayo 2009	Primavera
Sandiego	CFSAN039537	MEKF00000000	Río Humaya	Febrero 2009	Invierno
Muenchen	CFSAN039541	MEKG00000000	Río Culiacán	Junio 2009	Verano
Kedougou	CFSAN039534	MEKD00000000	Río Culiacán	Mayo 2009	Primavera
Oranienburg	CFSAN039536	MEJX00000000	Río Humaya	Febrero 2009	Invierno

B ANOTACIÓN DE GENOMAS

La anotación de los genomas de las cepas en estudio se realizó en el servidor RAST (Anotación rápida utilizando tecnología de subsistemas, por sus siglas en inglés), siguiendo los pasos especificados en la plataforma (<http://rast.nmpdr.org/>) (Aziz y col., 2008). La anotación genómica obtenida en NCBI se registró en la base de datos de genomas on line (GOLD, siglas en inglés), posteriormente, las secuencias genómicas también se anotaron en el sistema Genomas Microbianos Integrados (IMG, siglas en inglés) (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) (Markowitz y col., 2012).

C ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol filogenético se construyó basándose en la comparación de la secuencia nucleotídica de la subunidad menor ribosomal (rRNA 16S) en las 7 cepas de NTS y 17 especies cercanamente relacionadas de *Salmonella* disponibles públicamente en NCBI. La historia evolutiva fue evaluada utilizando el método Neighbor-Joining (Wang y col., 2015) y visualizada con el software FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). *E. coli* str. MPECX-33 fue usada como grupo externo.

D ANÁLISIS DEL PANGENOMA DE CEPAS NTS

Para realizar el análisis pangenómico, se utilizaron las secuencias genómicas de las cepas NTS en formato genbank para agrupar las secuencias nucleotídicas

y las secuencias de proteínas codificantes (CDS, siglas en inglés) identificadas mediante anotación con NCBI. Las secuencias fueron agrupadas y visualizadas con el servidor Gview (versión 3.0) (Petkau y col., 2010). Los parámetros por defecto utilizados fueron un análisis BLASTn con valor límite esperado de 1×10^{-10} , código genético bacteria, 80% de identidad y una longitud de alineamiento de 10 pb. Los genomas de las cepas de *S. Typhimurium* LT2, *S. Typhimurium* 14028, *S. Enteritidis* 771427 and *S. Enteritidis* CDC2010K0968 se incluyeron como cepas patogénicas transmitidas por alimentos representativas para un análisis comparativo.

E POTENCIAL PATOGENICO *in silico*

1 Virulotipificación

Se realizó una intensa búsqueda bibliográfica para crear una base de datos de genes de virulencia presentes en *Salmonella*; se seleccionaron 164 genes relacionadas a SPI 1-5 (122 genes), fimbrias (38 genes) e hipermutación (4 genes). Después, se realizó una búsqueda de homología utilizando secuencias de genes de referencia apropiados de la base de datos NCBI, incluyendo a *Salmonella* Typhimurium LT2 como genoma de referencia de una cepa patogénica. Se utilizó el programa BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local, siglas en inglés) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para obtener el porcentaje de similitud del gen de interés. Se construyó un mapa de calor con el programa estadístico XLSTAT (versión 3.5) basándose en el

porcentaje de similitud de los genes buscados en todas las características patogénicas (Halder y col., 2017). Además, se midió un índice relativo del potencial patogénico de las cepas NTS y del contenido de cada una de las características de patogenicidad (SPI 1-5, fimbrias e hipermutación) en función del porcentaje de genes totales presentes (98 % de similitud) en cada categoría.

2 Diagrama de venn para genes de patogenicidad

Se analizó el genoma núcleo de virulencia de las cepas en estudio; para lo que se seleccionaron 401 genes anotados con el servidor RAST, clasificados dentro de subsistemas que contribuyen a la patogenicidad de la bacteria: a) virulencia y defensa, b) sistema de secreción, c) metabolismo y adquisición de hierro, d) regulación y c) respuesta a estrés. Para la clasificación de los genes seleccionados se utilizó el programa VennPainter (versión 1.2.0) (Lin y col., 2016). Se incluyó como cepa de referencia a *S. Typhimurium* LT2 para análisis de comparación.

F POTENCIAL PATOGENICO *in vitro*

1 Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas incluidas en este estudio se encontraban almacenadas a -80 °C en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico (LIDiM). Para su reactivación, se estriaron en agar enterico Hektoen (Becton Dickinson) y se

incubaron a 37 °C durante 24 h. Se observó la presencia de colonias características de *Salmonella* (colonias negras con halo transparente).

2 Líneas celulares

Las líneas celulares epiteliales humanas Caco-2 y la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 se mantuvieron en botellas de cultivo de 25 cm² (Corning) en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (FBS; Sigma-Aldrich) previamente descomplementado a 56 °C durante 30 min, L-glutamina 200 Mm (Sigma-Aldrich) y antibiótico-antimicótico (ampicilina 10,000 U/MI, estreptomina 100 mg/MI y anfotericina B 25 µg/MI; Sigma-Aldrich) a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. La línea celular RAW 264.7 se estimuló con 10 ng/MI de LPS (*E. coli* 0111:B4; Sigma-Aldrich) durante 48 h (Mosser y Zhang, 2008, Ramírez y col., 2018).

3 Conteo celular

Las líneas celulares se crecieron hasta 70-80 % de confluencia, posteriormente se lavaron con 10 mL de PBS; para el caso de las células epiteliales Caco-2 la monocapa se despegó con 3 mL de Tripsina-EDTA (0.5 g de tripsina porcina, 0.2 g EDTA; Sigma-Aldrich) durante 5 min a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂; para macrófagos RAW 264.7 la monocapa se despegó con 10 mL de 0.02 % de EDTA (ácido etildiaminotetraacético; J.T.Baker)

en PBS durante 10 min en frío. Las células se centrifugaron 5 min a 1,500 rpm. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 2 mL de medio suplementado sin antibiótico. Posteriormente, 50 μ L del cultivo se diluyeron (1:2) en 50 μ L de azul de tripano (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf. Se transfirieron 10 μ L de la dilución a una cámara de Neubauer (0.100 mm de profundidad, Hausser scientific) y las células se enumeraron en un microscopio óptico invertido para obtener el número de células viables por mL. Después, en placas de 24 pozos, se transfirieron aproximadamente 5×10^4 células viables por pozo (Reissis y col., 2013; Louis y Siegel, 2011).

4 Preparación del inóculo bacteriano

Una colonia característica de *Salmonella* se seleccionó del medio Hektoen (Becton Dickinson) y se creció en 40 mL de caldo soya tripticaseína (TSB; Difco, México) a 37 °C durante 12 h. Posteriormente, se transfirió una alícuota de 1 mL del cultivo bacteriano a 40 mL de medio fresco y se incubó 3 h en agitación a 37 °C. La densidad óptica (600 nm) se ajustó aproximadamente a 0.35 U para cada cultivo, utilizando un espectrofotómetro (Buck Scientific), y se transfirió una concentración de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL a medio de cultivo celular para los ensayos de adherencia e invasión, mientras que para los ensayos de supervivencia intracelular se transfirió una concentración de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL a medio de cultivo celular. Inmediatamente, se realizó la inoculación de las líneas celulares.

5 Ensayo de adherencia e invasión

La capacidad de adherencia e invasión se determinó infectando células epiteliales Caco-2 con una multiplicidad de infección (MOI) de 100 bacterias por célula (inóculo de aproximadamente 1×10^7 UFC/mL) y se incubó 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Después, se descartó el medio y se realizaron 2 lavados con 1 mL de PBS. Para el ensayo de invasión, se adicionaron 500 µL de medio de cultivo con 100 µg/mL de gentamicina y se incubaron 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂, para eliminar la bacteria extracelular. Posteriormente, se lavaron con 1 mL de PBS y las células se lisaron con 1 mL de PBS con 1 % v/v de Triton X-100 (IBI Scientific) y 0.1 % p/v de dodecil sulfato sódico (SDS, IBI Scientific). Las bacterias intracelulares se numeraron por conteo en placa, sembrando diluciones seriadas del lisado en agar soya tripticaseína (TSA; Difco) (Steele-Mortimer, 2008). El número de bacteria adherida se evaluó con el mismo protocolo, pero sin el tratamiento con gentamicina (Dostal y col., 2014); solamente se realizaron dos lavados con 1 mL de PBS para eliminar la bacteria no adherida. A la par de los ensayos de infección se cuantificó el inóculo, para ello se realizaron diluciones seriadas en PBS y conteo en placa en agar TSA (Difco). El porcentaje de bacteria adherida y el porcentaje de bacteria invasiva se calcularon en base al inóculo inicial aplicado. La eficiencia de invasión se calculó como el porcentaje de bacteria invasiva con respecto a la bacteria adherida.

$$\% \text{ de adherencia} = \frac{\text{núm. de bacteria adherida}}{\text{núm. de bacteria inoculada}} \times 100$$

$$\% \text{ de invasión} = \frac{\text{núm. de bacteria invasiva}}{\text{núm. de bacteria inoculada}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de invasión} = \frac{\text{núm. de bacteria invasiva}}{\text{núm. de bacteria adherida}} \times 100$$

6 Ensayo de supervivencia intracelular

La supervivencia intracelular de los serotipos de *Salmonella* en macrófagos RAW 264.7 se evaluó mediante el ensayo de protección con gentamicina descrito por Glasser y col. (2001), con algunas modificaciones. Los macrófagos se inocularon con la bacteria a un MOI de 10 bacterias por macrófago (inóculo de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL) y se incubaron 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Después del tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con 1 mL de PBS y se agregaron 500 µL de medio de cultivo con 100 µg/mL de gentamicina por 1 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Posteriormente, los macrófagos infectados se lavaron con 1 mL de PBS y para determinar la supervivencia de la bacteria a diferentes tiempos, los macrófagos se mantuvieron en 1 mL de medio con 20 µg/mL de gentamicina. El número de

bacteria intracelular se determinó después de 1, 3, 6, 24 y 48 h después de la infección. A cada tiempo, la monocapa se lisó con 1 mL de PBS con 1 % v/v de Triton X-100 (IBI Scientific) y 0.1 % p/v de SDS (IBI Scientific). El número de bacteria sobreviviente se determinó por conteo en placa, sembrando diluciones seriadas del lisado en agar TSA (Difco). Para la cuantificación del inóculo se realizaron diluciones seriadas con PBS y conteo en placa en agar TSA (Difco). Los resultados se expresaron como promedios de UFC/mL en cada tiempo de infección.

7 Viabilidad celular

La viabilidad de la línea celular epitelial Caco-2 se determinó después de 48 h de infección. La monocapa de células epiteliales se despegó agregando 300 μ L de tripsina-EDTA (Sigma-Adrich) a cada pozo y se incubó 5 min a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂; después del tiempo de incubación se llevaron a 1 mL con medio de cultivo celular. Para el caso de los macrófagos se agregó 1 mL de 0.02 % de EDTA en PBS frío durante 10 min. Posteriormente, se tomaron 50 μ L de cada pozo y se mezclaron con 50 μ L de azul de tripano (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf para obtener una dilución 1:2. Se tomaron 10 μ L de la dilución en cada pozo y se montaron en una cámara de Neubauer (0.100 mm de profundidad, Hausser scientific). En un microscopio óptico se contaron las células viables y no viables por campo para obtener el número de células viables por mililitro y el número total de células por mililitro. El porcentaje de viabilidad celular

se obtuvo mediante la siguiente formula (Reissis y col., 2013; Louis y Siegel, 2011):

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{núm. de células viables}}{\text{núm. total de células}} \times 100$$

G ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA

1 Ensayo de supervivencia a peróxido de hidrógeno

Los serotipos de *Salmonella* se crecieron toda la noche en medio de cultivo TSB a 37 °C y posteriormente se diluyeron 1/100 en medio TSB con pH 7 y se agregaron H₂O₂ 15 mM. Los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación durante 30 min. Se sembraron por triplicado alícuotas de los cultivos en tiempo 0 y después de los 30 min de incubación. La supervivencia se expresa como porcentaje de UFC a los 30 min, considerando como 100 % la cuenta de UFC al tiempo 0 (Retamal y col., 2015).

2 Ensayo de supervivencia a nitrito de sodio

Los serotipos de *Salmonella* se crecieron toda la noche en medio de cultivo TSB 37 °C y posteriormente se diluyeron 1/100 en medio TSB con pH 5 y se agregaron NaNO₂ 10 mM. Los cultivos se incubaron a 37 °C en agitación durante 3 h. Se sembraron por triplicado alícuotas de los cultivos en tiempo 0 y después de 3 h de incubación. La supervivencia se expresa como porcentaje de UFC a

las 3 h, considerando como 100 % la cuenta de UFC al tiempo 0 (Retamal y col., 2015).

3 Ensayo de supervivencia a pH ácido

Las bacterias se crecieron toda la noche a 37 °C en medio TSB, se lavaron 3 veces con medio TSB pH 3 (ácido cítrico 0.1 M), se diluyeron 1/100. Los cultivos se incubaron en agitación 3 h a 37 °C. Se sembraron por triplicado alícuotas de los cultivos en tiempo 0 y después de 3 h de incubación. La supervivencia se expresó como porcentaje de UFC a las 3 h, considerando como 100 % la cuenta de UFC al tiempo 0 (Retamal y col., 2015).

4 Ensayo de supervivencia inanición

Las bacterias se inocularon en medio MOPS-Buffer salts (MS) hiPCN (MS, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 25 mM pH 7.4, glucosa 0.4 %, NH_4Cl 15 mM) y se incubaron 18 h a 37 °C. Los cultivos se lavaron con agua destilada, se diluyeron 1/10 en medio MS loPCN (MS, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1 mM pH 7.4, glucosa 0.2 %, NH_4Cl 10 mM) y se incubaron a 37 °C hasta obtener una OD_{600} 0.3-0.4. Posteriormente, 1 mL de la suspensión bacteriana se lavó con agua destilada, se inoculó en 5 mL de medio MS y se incubó durante 40 días a 37 °C. Alícuotas de los cultivos se sembraron por triplicado a diferentes tiempos. La supervivencia en los diferentes tiempos se expresó como porcentaje de UFC considerando como 100 % la cuenta máxima de UFC alcanzada el primer día de incubación (Retamal y col., 2015).

H ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis multivariado de las estadísticas genómicas obtenidas para definir clados entre las cepas NTS (Minitab vs. 19). El diseño experimental utilizado fue de un factor (serotipo) completamente al azar para los resultados obtenidos de los ensayos de adherencia, invasión y viabilidad celular, y medias repetidas para los resultados obtenidos de los ensayos de supervivencia intracelular; todos los ensayos se realizaron con 3 réplicas y 2 repeticiones. En el análisis de los datos de los ensayos de estrategias de supervivencia se utilizó un diseño experimental de un factor con 5 niveles con 2 réplicas y 2 repeticiones. Las variables de respuesta fueron analizadas por el método de análisis de varianza (ANOVA) y para el análisis comparativo se utilizó el método de comparación de medias de Tukey (Minitab 19). Una diferencia se consideró significativa si $P \leq 0.05$.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de diferentes cepas de *Salmonella* en fuentes de agua de río es una clara evidencia de su contaminación, y evidencia el agua como vehículo de transmisión de este patógeno (Winfield y Groisman, 2003). La relación epidemiológica entre la bacteria, el agua y los casos de enfermedades transmitidas por alimentos no ha sido claramente establecida, por lo que es necesario un mayor estudio.

La secuenciación y anotación de cepas NTS aisladas de medios acuáticos contribuye al entendimiento de la diversidad del contenido genómico de *Salmonella*. Presuntamente, fuentes de agua juegan un papel decisivo en la dispersión de múltiples cepas NTS en México. Varios estudios han sido realizados con el fin de diferenciar serotipos y clones circulantes en estas fuentes de agua (Estrada-Acosta y col., 2014; Jiménez y col., 2014). Otros estudios han generado información de genomas *draft* correspondientes a serotipos de *S. Oranienburg* (Medrano-Félix y col., 2013; Castañeda-Ruelas y col., 2017) y *S. Saintpaul* (Estrada-Acosta y col., 2013) aislados de agua de río en Culiacán, Sinaloa.

Se caracterizaron *drafts* genomas de alta calidad de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa; y su potencial patogénico fue estudiado para evidenciar propiedades claves para colonizar hospederos humanos.

A CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS GENOMAS

Los genomas de alta calidad de siete cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México se caracterizaron y registraron en las bases de datos del Sistema IMG y GOLD. El **cuadro 3** muestra los códigos de acceso a las bases de datos de IMG y GOLD; mientras que la **Fig. 7** representa las estadísticas genómicas obtenidas.

Los genomas previamente secuenciados en la plataforma Illumina tuvieron un promedio de cobertura de ~69 lecturas. Las secuencias genómicas variaron de tamaño desde 4.61 Mb para el más pequeño (*S. Oranienburg* CFSAN039536) hasta 5.12 Mb para el más largo (*S. Pomona* CFSAN039526). Las cepas estudiadas presentaron porcentaje similar de contenido de guanina-citosina (G-C) (51.0-52.1 %) y mostraron diferencias en el número total de genes, genes codificadores de proteínas, genes RNA y pseudogenes; esta variación coincidió con la variación del tamaño del genoma. *S. Pomona* CFSAN039526 presentó el tamaño de genomas más largo comparado con las otras cepas NTS; mientras que *S. Oranienburg* CFSAN039536 presentó el menor tamaño de genoma. El contenido promedio de número de genes asignado a predicción funcional, “cluster” internos, categoría funcional COG (categorías de grupos ortólogos, siglas en inglés) y dominios Pfam (familias de proteínas, siglas en inglés) fueron 4,053 genes, 1,173 genes, 3,477 genes y 4,161 genes, respectivamente.

Estos resultados muestran que las cepas NTS aisladas de agua poseen atributos genómicos previamente reportados para *Salmonella* (Dhanani y col.,

2015). *S. Typhimurium* LT2 (ATCC 700720) es una de los primeros genomas completos reportados, con % G-C (53.0 %), tamaño de genoma (4.9 Mb), y número total de genes (4,605) (McClelland y col., 2001) similares a los de las cepas NTS estudiadas, y ha sido ampliamente utilizada como cepa patogénica de referencia. La pequeña variación en la estructura genómica observada entre las cepas puede deberse a su prevalencia y distribución en agua de río, por presión selectiva (Dhanani y col., 2015).

El análisis multivariado agrupó las cepas NTS en 3 clados (I, II y III) distribuidos en los ríos y tiempos de aislamientos (**Fig. 7**). Las estadísticas genómicas mostraron baja variación (0.96 – 4.76 % C.V.) entre las cepas NTS (**Fig. 8**), excepto para el contenido de pseudogenes (53.07 % C.V.), los cuales se observaron con gran variación entre las cepas. Estudios recientes señalan que los pseudogenes son funcionales y regulan otros genes (Tariq y col., 2016). Se ha señalado que en *S. Typhimurium* los pseudogenes producen proteínas muy diferentes con únicas funciones, como la regulación de otros genes o jugar un papel importante en el desarrollo de la infección (Tariq y col., 2016).

La **Fig. 9** muestra el comportamiento de las cepas NTS en tres clados distribuidos en tiempo y lugar de aislamiento. Las cepas NTS agrupadas dentro del clado II (5 de las 7 cepas estudiadas), se distribuyó en ambos ríos y años de aislamiento. *S. Oranieburg* se separó del resto de las cepas (clado I) por su menor contenido genómico, aislada en el río Humaya en 2009; por su parte, *S. Pomona* se separó del resto de las cepas, pero por su mayor contenido genómico (clado

III), fue aislada en el río Culiacán en 2008, revelando la posible adquisición de nuevo arsenal genómico que permite su adaptación en ambientes acuáticos.

Cuadro 3. Códigos de acceso a bases de datos públicas de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa.

Cepa	Número de acceso a GOLD	Número de acceso a IMG
S. Give CFSAN039524	Ga0176284	2757320577
S. Pomona CFSAN039526	Ga0173866	2757320581
S. Stanley CFSAN039535	Ga0176285	2757320578
S. San Diego CFSAN039537	Ga0173869	2757320580
S. Muenchen CFSAN039541	Ga0176286	2757320583
S. Kedougou CFSAN039534	Ga0173868	2757320579
S. Oranienburg FSN039536	Ga0176282	2757320582

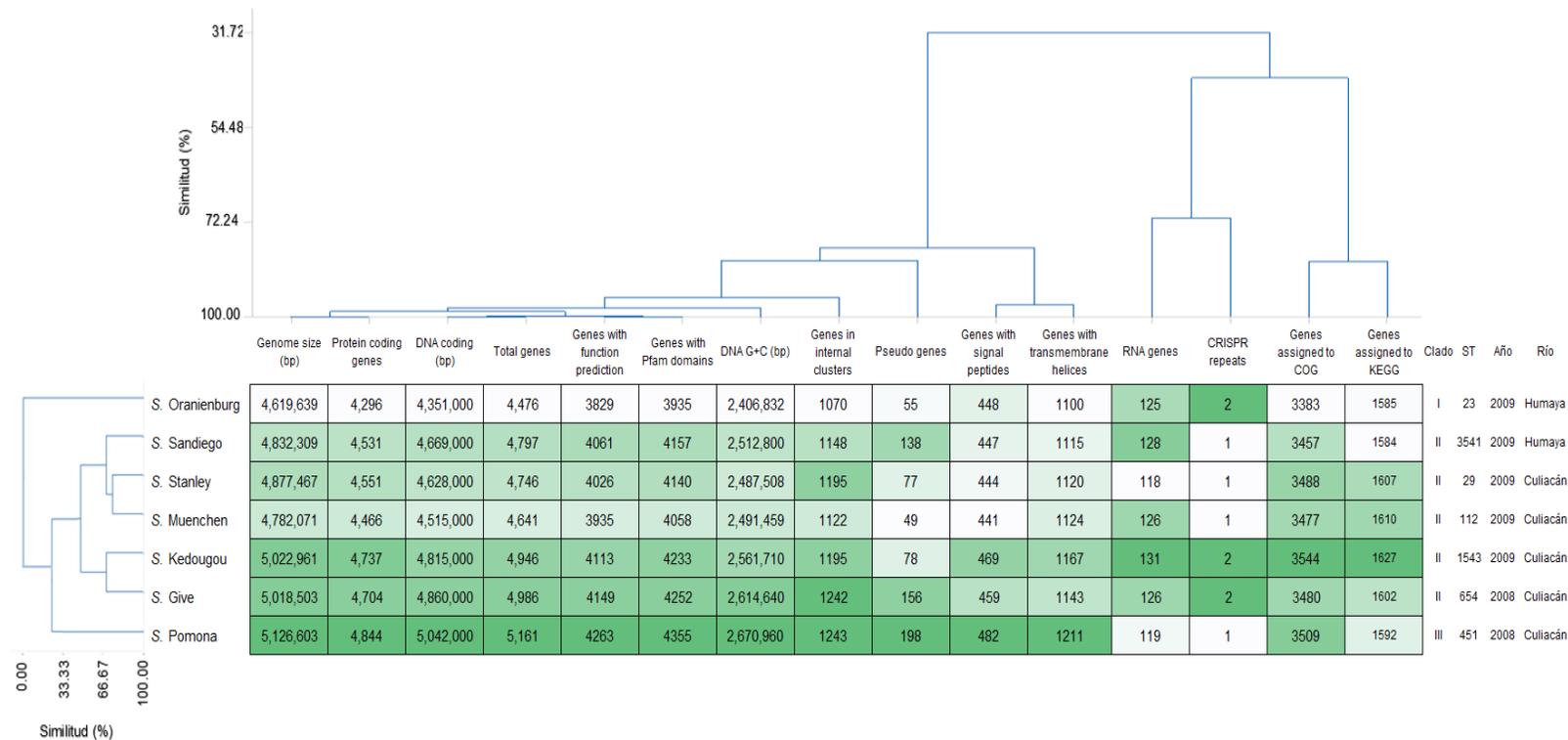


Fig. 7. Estadísticas del contenido genómico de cepas NTS aisladas de agua de río en Culliacán, Sinaloa. Análisis multivariado para definir clados entre las cepas, la distancia se midió con el método Euclidiano. La escala verde-blanco se relaciona con alto a bajo contenido.

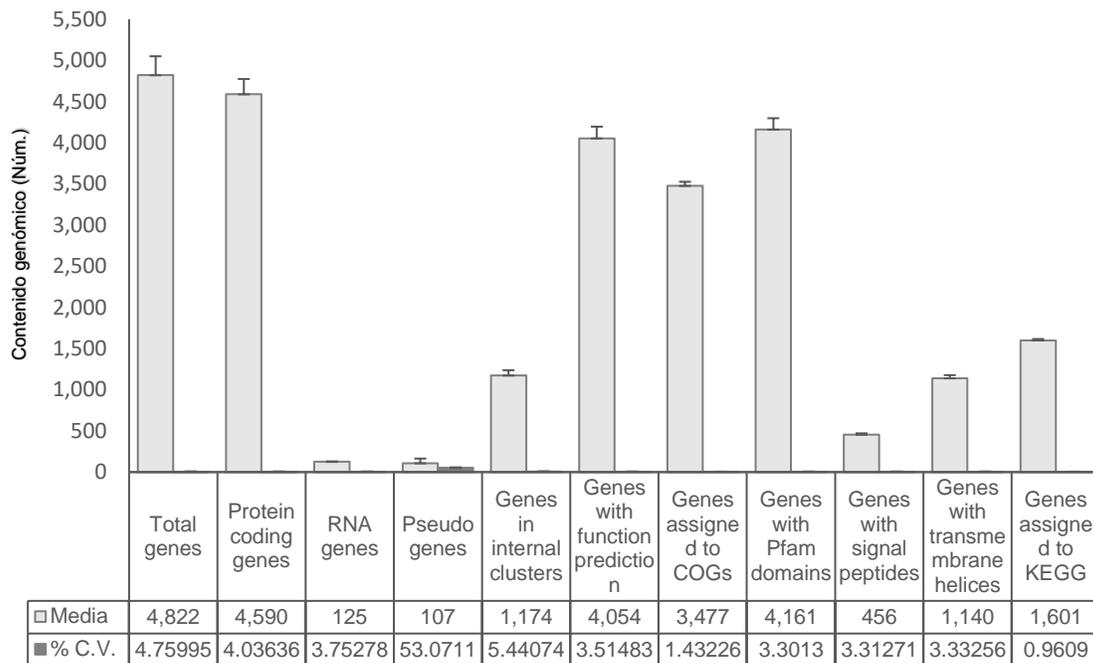


Fig. 8. Grafica de barras de la media y coeficiente de variación (%) de las estadísticas genómicas de las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Las barras de error muestran la desviación estándar de las medias.

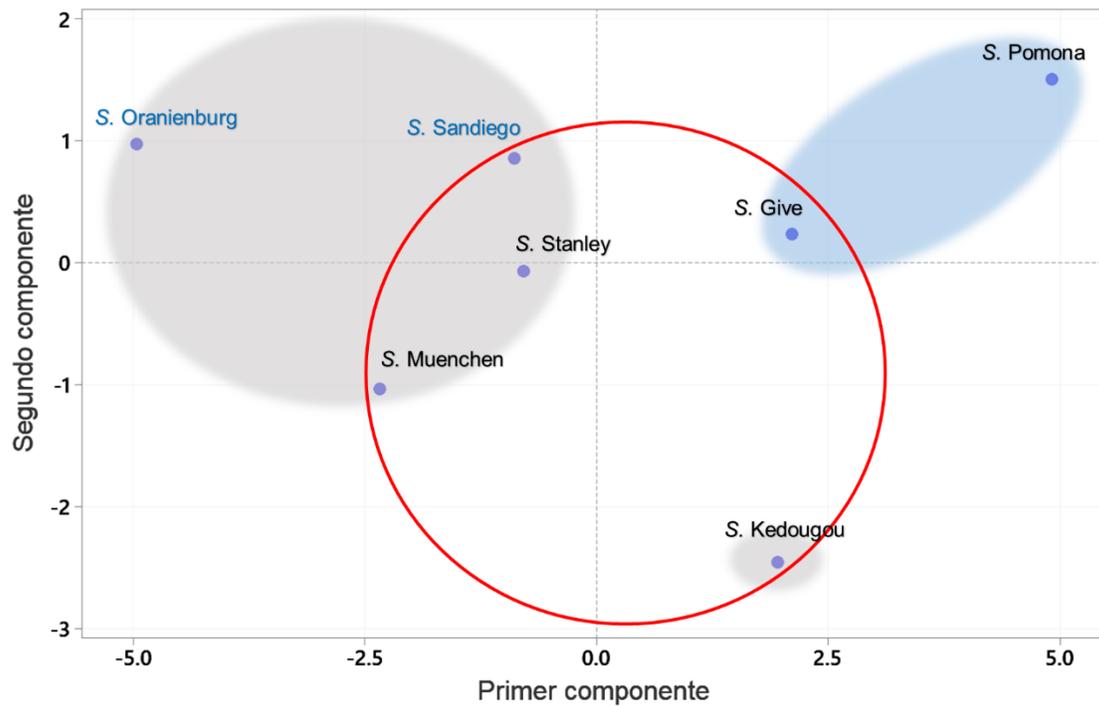


Fig. 9. Análisis de componentes principales de las estadísticas genómicas de las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Las zonas color azul (2008) y gris (2009) representan el año de aislamiento. Las letras azules (río Humaya) y negro (río Culiacán) representan el río donde fueron aisladas. El círculo rojo muestra el clado II donde se agruparon la mayoría de las cepas NTS (5/7 cepas).

B ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol filogenético construido con base en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas NTS aisladas de agua de río y 17 cepas estrechamente cercanas a las especies de *Salmonella* (públicamente disponibles en la base de datos de NCBI), separó claramente todas las cepas de *Salmonella* de la cepa externa *E. coli* MPECEX-33. Además, la posición de estas cepas en el análisis filogenético revela su lugar dentro de la especie entérica subespecie entérica (**Fig. 10**). Este análisis filogenético clasificó las cepas y mostró su relación genética dentro de la especie entérica.

El análisis filogenético clasificó las cepas y mostró su relación genómica a la especie *S. entérica*. Sin embargo, se sugiere para posteriores estudios realizar un análisis de la secuencia de proteínas concatenadas para reforzar la evidencia de la historia evolutiva de estas cepas NTS (Wang y col., 2015).

El estudio de secuencias multilocus (MLST) es una excelente herramienta de clasificación ampliamente utilizado para determinar la relación epidemiológica y geográfica entre cepas de *Salmonella* (Retamal y col., 2015). Las cepas NTS estudiadas presentan un ST diferente para cada una (**Fig. 7**); por lo que, aunque estas cepas NTS aisladas de agua son muy cercanas, muestran pequeñas variaciones filogenéticas que pueden deberse a su serotipo y a su prevalencia y distribución en ambientes acuáticos.

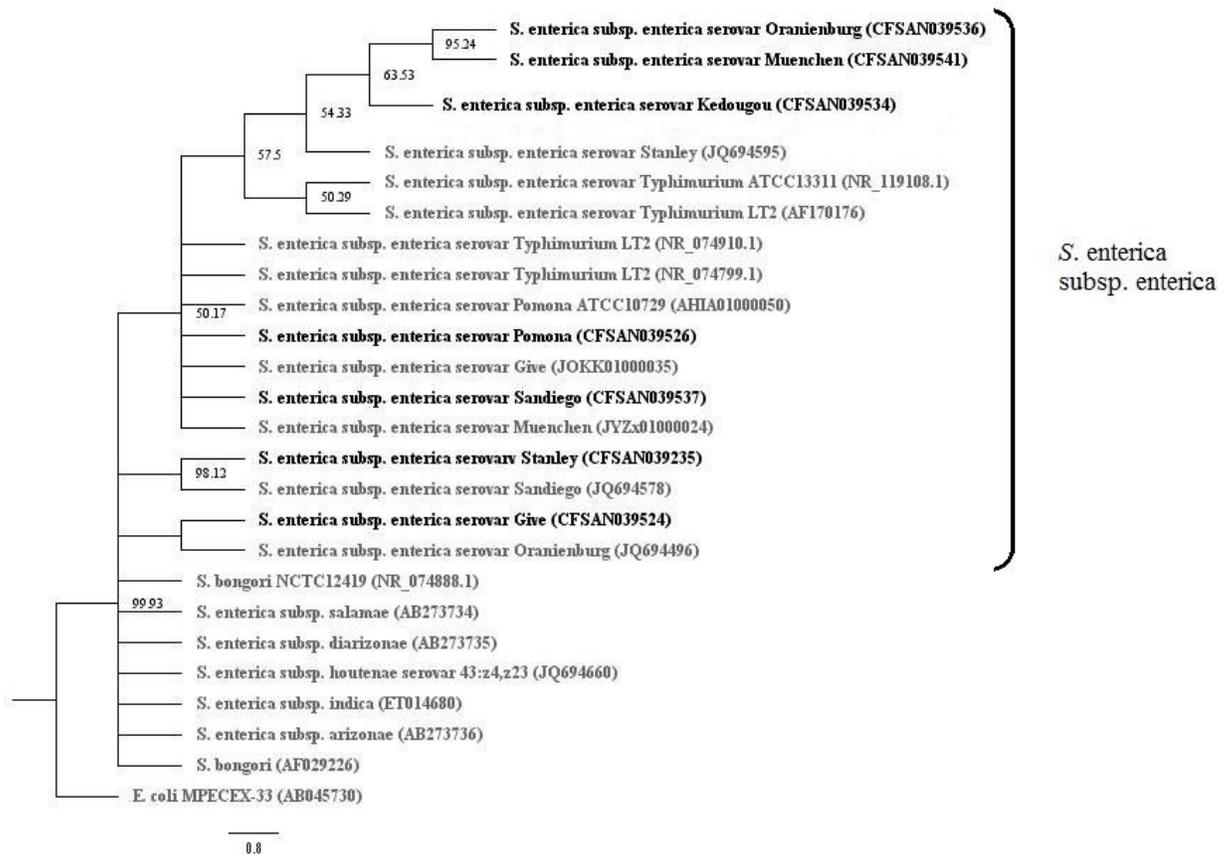


Fig. 10. Análisis filogenético de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. El Árbol filogenético muestra la posición evolutiva de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa (marcadas con negro) en relación con otras cepas de *Salmonella*. El árbol filogenético fue construido basándose en la secuencia del gen 16S rRNA. La historia evolutiva fue evaluada usando el método “neighbor-joining” en el programa FigTree (v1.4.3.). *E. coli* MPECEX-33 (AB045730) se incluyó como grupo externo.

C PANGENOMA DE CEPAS NTS

Para un mayor entendimiento de la relación y variaciones genómicas de las cepas NTS aisladas de agua de río; se construyó el pangenoma con base en las secuencias genómicas de 11 cepas de *Salmonella* incluyendo las 7 cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Se obtuvo un pangenoma abierto construido con las secuencias de DNA (**Fig. 11**) y secuencias CDSs (**Fig. 12**); observando notablemente la contribución de nuevas regiones de secuencias genómicas proporcionadas por las cepas NTS aisladas de agua de río. Las cepas analizadas tienen un coregenome basado en su secuencia de DNA de aproximadamente 4.8 Mb ($\approx 90\%$) (**Fig. 11**). Por otra parte, en el análisis del pangenoma construido en base a CDSs, un total de 8,201 CDSs fueron identificadas entre las cepas, de las cuales 3,724 CDSs (45 %) representan el coregenome (**Fig. 12**). *S. Pomona* mostró mayor número de CDSs únicos entre las cepas NTS, mientras que *S. Oranienburg* mostró menor número de CDSs únicos; lo que coincide con el análisis de las estadísticas genómicas (**Fig.13**). La mayor parte de CDSs únicos para cada serotipo se asocian principalmente a profagos, resistencia antimicrobiana y proteínas hipotéticas.

Este estudio nos permitió observar la contribución de nuevo contenido genómico por cepas aisladas de un ambiente acuático en comparación con las principales cepas de origen clínico; donde las principales diferencias podrían ser asociadas por diferentes ciclos de vida de patógenos adaptados a diferentes ambientes. La plasticidad del genoma de *Salmonella* ha sido ampliamente

documentada, y se ha implicado que su evolución se ha caracterizado por la pérdida de genes, principalmente relacionados con funciones metabólicas, y/o por la adquisición de nuevos genes mediante transferencia horizontal, adquisición de fagos o plásmidos (Fricke y col., 2011), lo que aumenta el pangenoma de estas cepas, evidenciando genes adquiridos por cepas específicas, así como también genes compartidos por todas las cepas (Leekitcharoenphon y col., 2012). Jacobsen y col., (2011) describe que cepas que mantienen un dinámico cambio entre el medio ambiente y nuevos hospederos, aportan contenido genómico diverso y enriquecen el estudio pangenómico. El cambio genómico entre ambiente y bacterias, incluyendo *Salmonella*, ha sido ampliamente descrito. La evolución genómica de *Salmonella* se ha caracterizado por la contribución de nuevos genes y puede contribuir en su adaptación en diferentes ambientes (Leekitcharoenphon y col., 2012). La comparación entre cepas de serotipos patógenos en humanos más reconocidos (*S. Typhimurium* LT2; *S. Typhimurium* 14028s, *S. Enteritidis* 771427, *S. Enteritidis* CDC2010k 0968) y cepas NTS aisladas del medio ambiente, nos permite hipotétizar acerca de que genes distintivos para cada cepa, pueden ser asociados a su virulencia. Encontrando que cepas patogénicas y cepas aisladas de ambientes acuáticos comparten un importante número de regiones genómicas, que soportan la habilidad de colonizar nuevos hospederos, como los seres humanos.

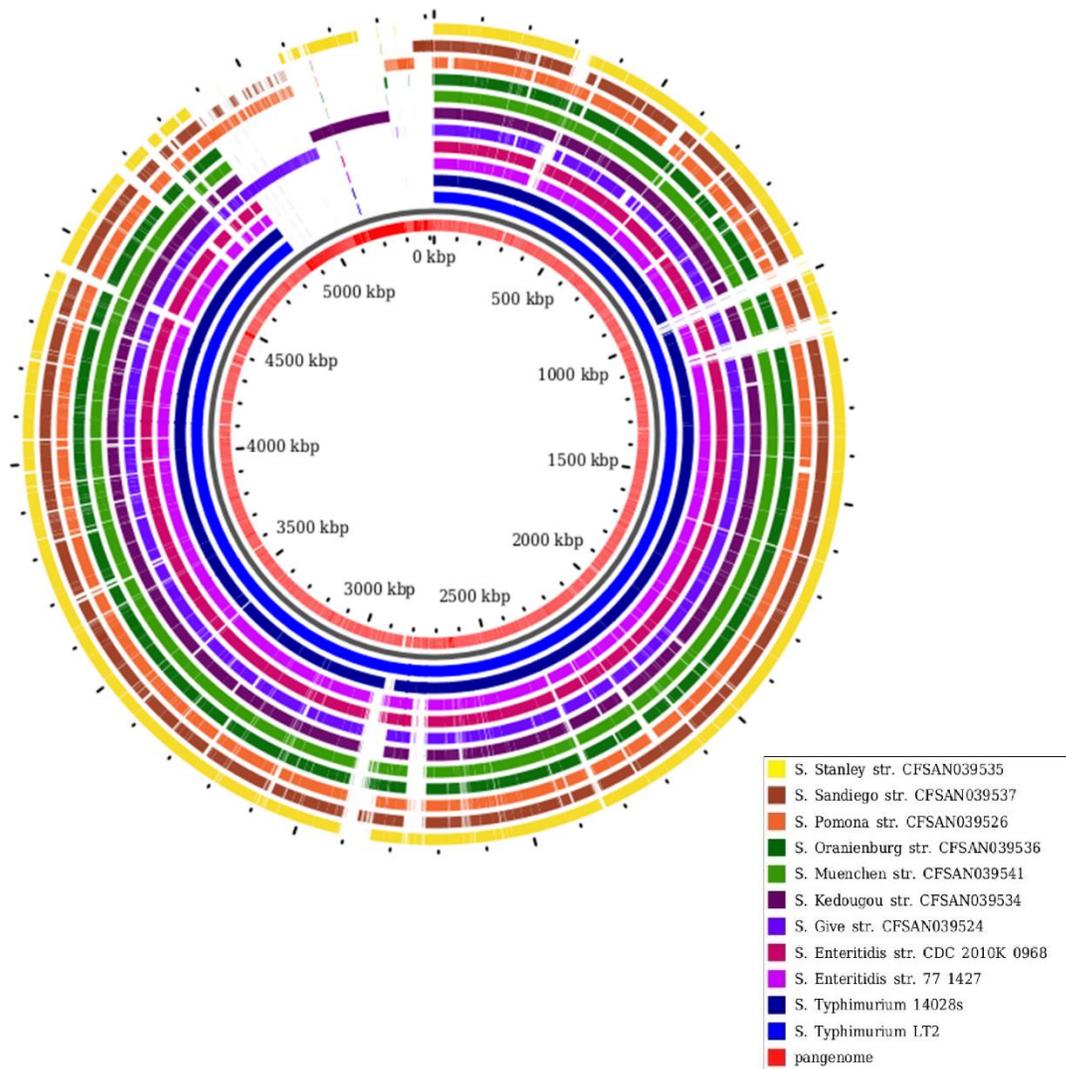


Fig. 11. Pangenoma de secuencias genómicas de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México. El pangenoma se construyó con el servidor Gview. La banda más interna muestra el pangenoma construido y las bandas externas indican los genomas específicos de la cepa NTS.

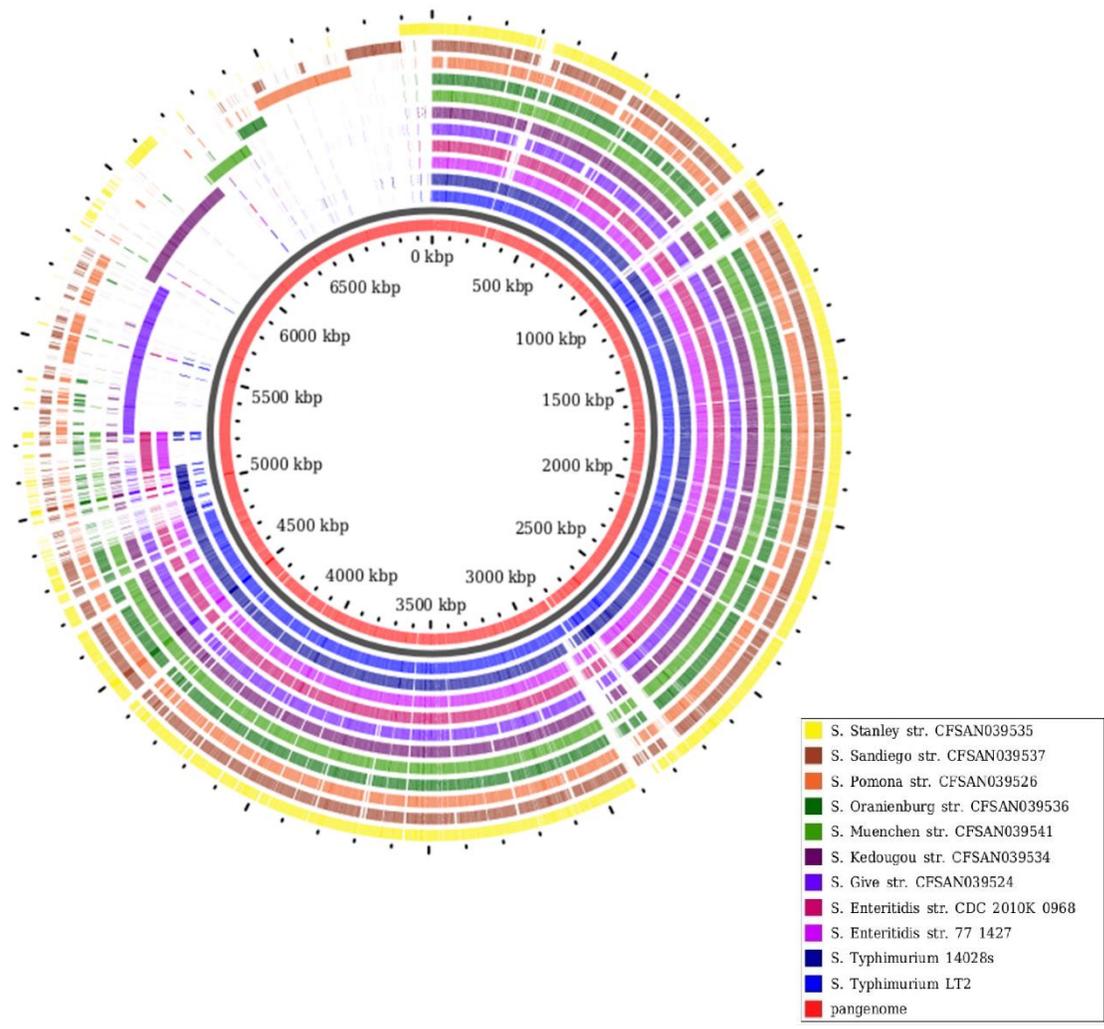


Fig. 12. Pangenoma de CDSs de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México. El pangenoma se construyó con el servidor Gview. La banda más interna muestra el pangenoma construido y las bandas externas indican los genomas específicos de la cepa NTS.

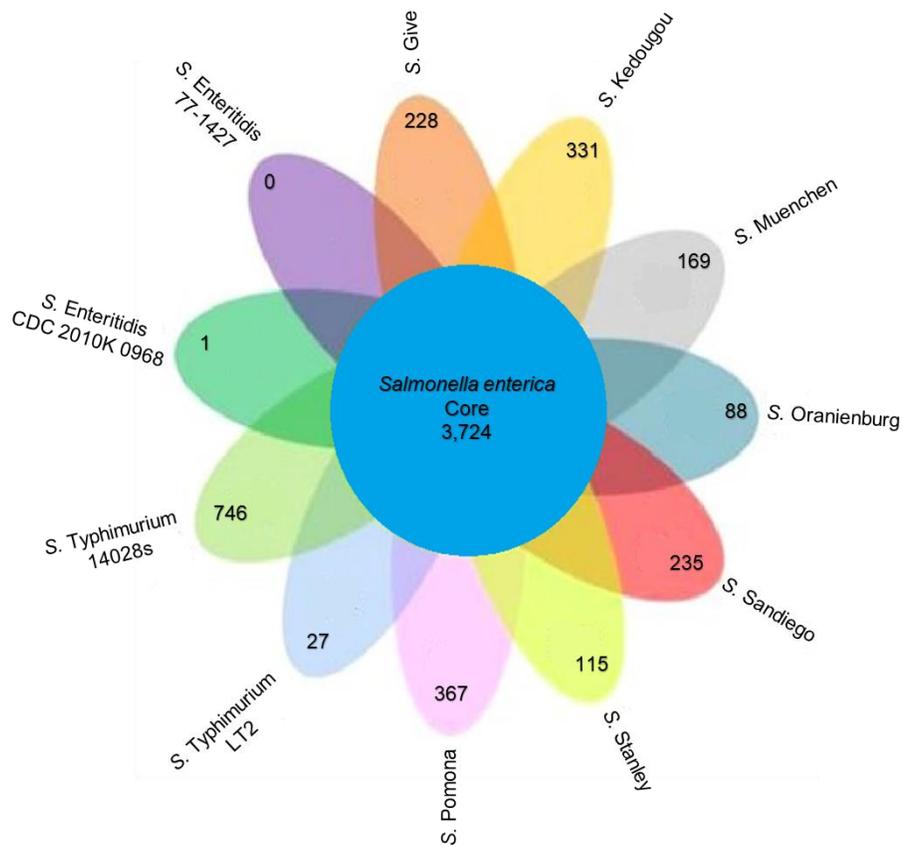


Fig. 13. Diagrama de flores que ilustra el número de CDS únicos para cada cepa NTS (en los pétalos) y el coregenoma de *Salmonella enterica* (en el medio). El análisis se realizó con el servidor Gview

D CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES GENERALES

Para estudiar más a fondo las características genómicas que respaldan las funciones metabólicas de *Salmonella*, se utilizó la anotación funcional para clasificar los genomas estudiados de acuerdo a diferentes bases de datos, incluyendo COG, Pfam y vías en la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG, siglas en inglés) (**Fig. 14**). Estas anotaciones pueden verse en la plataforma del sistema IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) con los códigos de identificación IMG mostrados en el **cuadro 3**.

La anotación funcional mostró el mismo comportamiento entre las cepas acuáticas y justificó la capacidad de *Salmonella* para establecer el ciclo dentro del hospedero y su supervivencia en el medio ambiente. Del total de genes anotados en los genomas de las 7 cepas NTS, un promedio del 72.0 %, 86.0 % y 33.2 % se clasificaron dentro de las categorías COG, Pfam y KEGG, respectivamente. En estas tres bases de datos, la mayoría de los genes de todas las cepas se agruparon en las categorías de transporte y metabolismo de aminoácidos y carbohidratos.

Las cepas NTS mostraron un arsenal de genes ortólogos que implican que estas cepas son simbiotes en el ecosistema acuático. *Salmonella* remodela su metabolismo para su adaptación a diferentes entornos a través de genes que codifican una amplia gama de vías metabólicas (Dandekar y col., 2015).

Medrano-Félix y col., 2017 describen que las bacterias entéricas metabolizan fuentes de carbono y conservan energía con la intención de sobrevivir en

ambientes acuáticos. De la misma manera, otros estudios se han realizado con el objetivo de definir el complejo metabolismo de *Salmonella* a través de su estructura genómica y/o fenotipo. De Moraes y col., (2017) infirieron que su metabolismo permite a *Salmonella* persistir en el medio ambiente e infectar nuevos hospederos. Como consecuencia de las actividades agrícolas y domésticas, en Culiacán, Sinaloa, existe un entorno acuático complejo y diverso que puede ser una influencia importante en la adaptación y prevalencia de *Salmonella* en este hábitat (Jiménez y col., 2014; Arellano y col., 2017). Las cepas NTS aisladas de agua de río mostraron un arsenal de genes principalmente asociados con el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, evidenciado por el metabolismo dinámico de estas cepas para adaptarse a diversos ambientes. Además de eso, el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos influye en su patogenicidad, activando genes que juegan un papel importante en la supervivencia y replicación de la *Salmonella* (por ejemplo, los genes *ssrAB*, *iacP*, *sopE*). Dandekar y col., 2015 explican cómo este metabolismo puede influir en las funciones SPI-1 y SPI-2. Además, las categorías KEGG clasifican un promedio de 1.86 % de los genes solamente como funciones en el desarrollo de la infección.

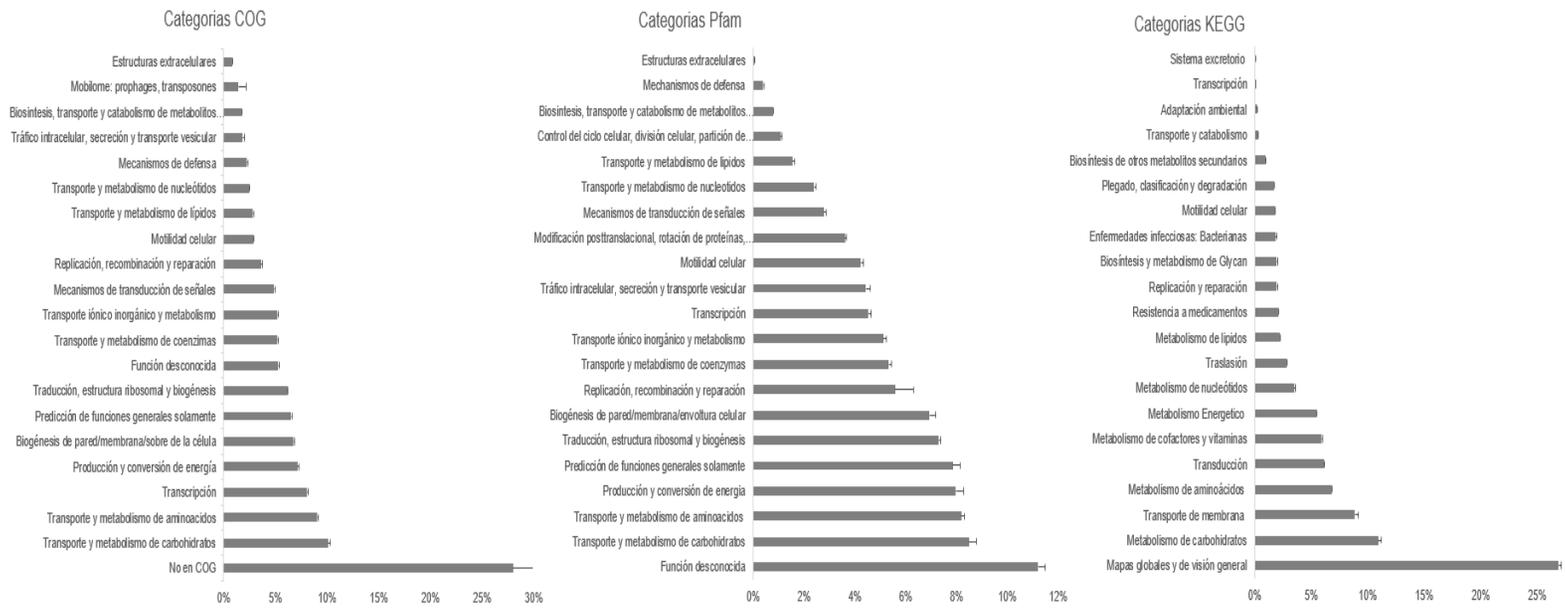


Fig. 14. Genes asignados categorías COG, Pfam y KEGG de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, México. Los valores son expresados en promedios de porcentajes en las 7 cepas NTS evaluadas.

E ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS PATOGÉNICAS

1 Coregenome de virulencia

El **cuadro 4** muestra el número de genes anotados con el servidor RAST en los genomas de las cepas NTS aisladas de agua de río, y que juegan un rol importante en la virulencia de *Salmonella*. Los genes seleccionados se clasificaron dentro de los subsistemas RAST: a) virulencia y defensa, b) sistemas de secreción, c) metabolismo de hierro, d) regulación y e) respuesta a estrés. El coregenome de genes de virulencia se compuso de 352 genes (87.8 %) (**Fig. 13**).

Cada una de las cepas mostró diferente perfil, se encontraron 36 genes accesorios y 13 genes únicos (**Cuadro 5**). Las cepas *S. Kedougou* CFSAN039534, *S. Stanley* CFSAN039535, *S. Pomona* CFSAN039526 y *S. Give* CFSAN039524 tuvieron 7 (*merT*, *merR*, *merP*, *merE*, *merD*, *merC*, *gcvZ*), 3 (*mo*, *crb*, *antA*), 2 (*zitB*, *fepC*) y 1 (*cspF*) gen único, respectivamente. Mientras que, *S. Typhimurium* LT2 mostró 12 genes accesorios.

El análisis comparativo de la virulencia de las cepas NTS revela el contenido genómico basal compartido todas las cepas NTS, incluyendo la cepa de referencia, además de mostrar que estas cepas poseen algunos factores moleculares de virulencia hipotéticamente dependientes del serotipo. Nuestros hallazgos enfatizan los genes únicos (*S. Kedougou*) son asociados principalmente con virulencia y resistencia metales (*merTRPEDC*, *mo*, *zitB* y *crb*); evidenciando este repertorio como resultado de su adaptación al medio ambiente, sin que esto afecte su virulencia. En particular, la presencia del cluster

mer codifica resistencia a metales, y esto pudiera ser reflejó la adaptación de estas cepas NTS al medio ambiente, ya que el uso de metales en algunas regios es continuo como consecuencia de actividades agrícolas (Mourao y col., 2015).

Los genes *entA* (*S. Stanley* CFSAN039535) y *fepC* (*S. Pomona* CFSAN039526) están implicados en el metabolismo de hierro; es ampliamente descrito que el metabolismo de hierro aumenta la virulencia de la bacteria (Nairz y col., 2017). Además, se encontró que los genes accesorios juegan un rol relevante en el ciclo de vida de *Salmonella* (**Cuadro 5**). El análisis del coregenome de genes de virulencia indica que las cepas NTS tienen la capacidad de adherirse e invadir células hospederas; relativamente similar a la mostrada por *S. Typhimurium* LT2.

Cuadro 4. Genes con funciones relacionadas con virulencia de cepas NTS aisladas de agua de río.

Subsistemas RAST	S. Give CFSAN039524	S. Pomona CFSAN039526	S. Muenchen CFSAN039541	S. Kedougou CFSAN039534	S. Stanley CFSAN039535	S. San Diego CFSAN039537	S. Oranienburg CFSAN039536	S. Typhimurium LT2
Virulencia y defensa	102	101	101	134	129	103	108	106
Sistemas de secreción	56	59	55	56	55	56	53	55
Metabolismo de hierro	26	27	26	26	26	26	25	26
Regulación	160	156	138	146	150	150	137	145
Respuesta a estrés	175	173	174	180	175	175	174	178

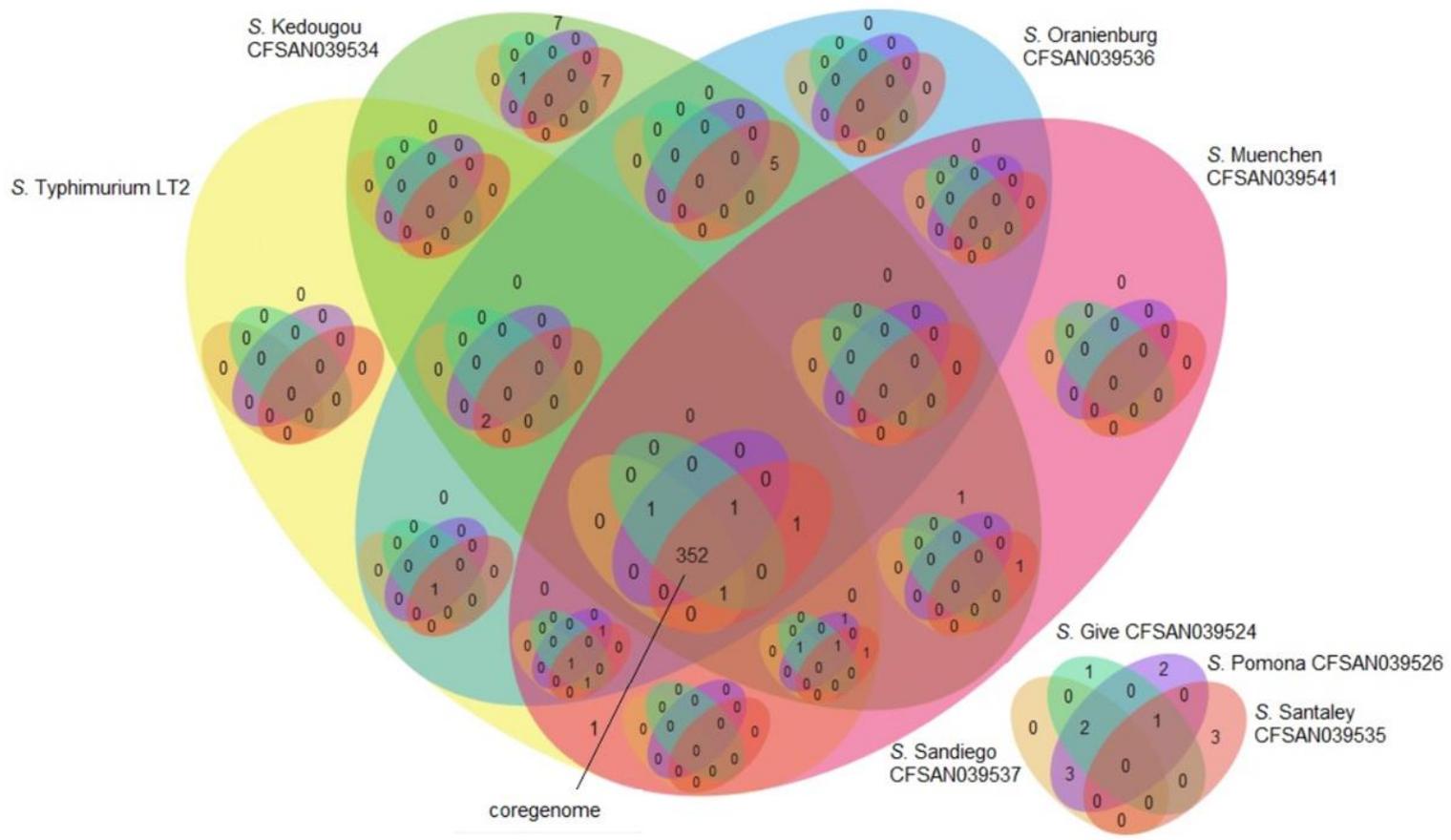


Fig. 15. Coregenome de genes de virulencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. El diagrama de ven anidado se construyó con el programa VennPainter

Cuadro 5. Virulotipos mostrados por genes únicos y accesorios de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán Sinaloa.

RAST Subsystems	Gene content	Functional role	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
Virulence and defense	Core Genome		■	■	■	■	■	■	■	■	
	CmeA	RND efflux system, membrane fusion protein CmeA	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CusA	Cation efflux system protein CusA	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CzcA	Cobalt-zinc-cadmium resistance protein CzcA	■	■	■	■	■	■	■	■	
	RND	Ribonuclease D	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MiIC	Membrane-bound lysozyme inhibitor of c-type lysozyme	■	■	■	■	■	■	■	■	
	HMHK	Heavy metal sensor histidine kinase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CusB	Putative copper efflux system protein CusB	■	■	■	■	■	■	■	■	
	BL	Beta-lactamase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	cusF	Cation efflux system protein CusF	■	■	■	■	■	■	■	■	
	cusC	Cation efflux system protein CusC precursor	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CusR	Copper-sensing two-component system response regulator CusR	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CopG	Cop G protein, Copper related functions	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CzrR	DNA-binding heavy metal response regulator	■	■	■	■	■	■	■	■	
	ARC3	Arsenical-resistance protein ARC3	■	■	■	■	■	■	■	■	
	arsR	Arsenical resistance operon repressor	■	■	■	■	■	■	■	■	
	arsD	Arsenical resistance operon trans-acting repressor ArsD	■	■	■	■	■	■	■	■	
	arsC	Arsenate reductase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	arsA	Arsenical pump-driving ATPase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	zitB	Zinc transporter ZitB	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerT	Mercuric transport protein, MerT	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerR	Mercuric resistance operon regulatory protein	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerP	Periplasmic mercury(+2) binding protein	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerE	Mercuric transport protein, MerE	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerD	Mercuric resistance operon coregulator	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MerC	Mercuric transport protein, MerC	■	■	■	■	■	■	■	■	
	MO	Multicopper oxidase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CRB	Copper resistance protein B	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Secretion systems	MxiG	MxiG protein	■	■	■	■	■	■	■	■
		YopP	T3SS injected virulence protein	■	■	■	■	■	■	■	■
		YopB	T3SS host injection protein (YopB)	■	■	■	■	■	■	■	■
		SpaO	Surface presentation of antigens protein SpaO	■	■	■	■	■	■	■	■
EprH		T3SS protein EprH	■	■	■	■	■	■	■	■	
SipD		Cell invasion protein SipD	■	■	■	■	■	■	■	■	
SsaB		T3SS protein SsaB	■	■	■	■	■	■	■	■	
SpaN_98		Surface presentation of antigens protein SpaN	■	■	■	■	■	■	■	■	
MxiH		MxiH protein	■	■	■	■	■	■	■	■	
YscF		T3SS cytoplasmic protein (YscF)	■	■	■	■	■	■	■	■	
Iron metabolism	FepA	Outer membrane receptor for ferric enterobactin and colicins B, D	■	■	■	■	■	■	■	■	
	entA	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	■	■	■	■	■	■	■	■	
	fepC	Ferric enterobactin transport ATP-binding protein FepC	■	■	■	■	■	■	■	■	
Regulation	SinR	LysR-family transcriptional regulator SinR	■	■	■	■	■	■	■	■	
	STM3121	LysR family transcriptional regulator STM3121	■	■	■	■	■	■	■	■	
	STM2912	LysR family transcriptional regulator STM2912	■	■	■	■	■	■	■	■	
	STM0764	LysR family transcriptional regulator STM0764	■	■	■	■	■	■	■	■	
	Ybbs	DNA-binding transcriptional activator of the <i>ald</i> operon	■	■	■	■	■	■	■	■	
	YcjZ	LysR family transcriptional regulator YcjZ	■	■	■	■	■	■	■	■	
	GcvZ	Glycine cleavage system transcriptional activator	■	■	■	■	■	■	■	■	
Stress response	Aqua	Aquaporin Z	■	■	■	■	■	■	■	■	
	CspF	Cold shock protein CspF	■	■	■	■	■	■	■	■	

(I) *S. Typhimurium* LT2, (II) *S. Giver* CFSAN039524, (III) *S. Pomona* CFSAN039526, (IV) *S. Muenchen* CFSAN039541, (V) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VI) *S. Stanley* CFSAN039535, (VII), *S. Sandiego* CFSAN039537 y (VIII) *S. Oranienburg* CFSAN039536.

2 Virulotipificación

Las cepas NTS mostraron un virulotipo indistinguible con un alto índice de virulencia con respecto a las propiedades de patogenicidad evaluadas (**Fig. 16 y 17**). De acuerdo al nivel de similitud, las cepas se clasificaron en dos grupos, lo que no coincidió con la clasificación encontrada en el contenido genómico, ya que *S. Oranienburg* (menor tamaño de genoma) y *S. Pomona* (mayor tamaño de genoma) se posicionaron dentro del mismo grupo de virulencia; lo que puede ser evidencia de que el contenido genómico que las distingue no pertenece a su arsenal de virulencia. Siendo los serotipos Stanley, Kedougou y Muenchen los que se agruparon en el clado con el índice de virulencia más alto, mientras que el resto de los serotipos se agruparon en un clado con menor índice de virulencia.

Los genes codificados dentro SPI evaluados están en su mayoría presentes entre las cepas NTS (las SPI 1, 2, 3, 4 y 5 tuvieron 97.5 % (39/40), 98.0 % (49/50), 86.9 % (10/12), 100 % (11/11) y 100 % (9/9) de los genes presentes, respectivamente); excepto los codificados dentro de la SPI-3 que fue la menos conservada. En general, las SPI 1-5 se observaron altamente conservadas en todas las cepas con un promedio de 96.7 % (118/122) de los genes; sin embargo, las cepas NTS difirieron en la presencia de 4 genes de virulencia codificados dentro de la SPI-1 (*avrA*), SPI-2 (*sseK1*) y SPI-3 (*rhuM*, *sugR*). El gen *rhuM* se encontró solo en la cepa *S. Sandiego* CFSAN039537. *S. Sandiego* CFSAN039537 mostró el mayor porcentaje de presencia de genes codificados dentro de SPI (**Fig. 17**).

Algunos estudios han demostrado que las SPI-1 y SPI-2 son genéticamente conservadas y codifican sistemas de secreción III que ayudan en los procesos de adherencia, invasión, replicación y supervivencia intracelular (Gerlach y Hensel, 2007; Moest y Méresse, 2013). Por otra parte, las SPI-3 y SPI-5 son menos conservadas, y también ayudan en la colonización del hospedero (Gerlach y Hensel, 2007).

Todas las cepas NTS tuvieron diferentes repertorios de genes codificadores de fimbrias (**Fig. 16**). Se observó 71.1 % (27/38) de los genes presentes en todas las cepas. *S. Muenchen* CFSAN039541 fue la única cepa que mostró la presencia del 100 % de los genes fimbriales evaluados. Todas las cepas NTS mostraron diferente perfil de genes fimbriales (73.4 %–100 %) (**Fig. 17**), evidenciando que esta característica es menos conservada en estas cepas. El contenido de estos genes es reflejo de la función de las fimbrias en la adherencia a diferentes superficies celulares, uno de los primeros pasos en la infección (Fabrega y Vila, 2013).

Los genes relacionados con hipermutación buscados estuvieron 100 % presentes en todas las cepas NTS (**Fig. 16**). El cluster mutHLS (mutH, mutL y mutS) y el gen uvrD, conservados en todas las cepas, muestran su función en la reparación del DNA y minimizando mutaciones (Dhanani y col., 2015).

En general, se observó un alto potencial de virulencia (92-98 %) (**Fig. 17**) en todas las cepas NTS aisladas de agua de río. A pesar de la ausencia de algunos genes, las cepas NTS aisladas de agua de río poseen la mayoría de los genes

que permiten el establecimiento del ciclo infeccioso y que soportan su carácter virulento. Sumado a ello, la conservación de genes de hipermutación evidencian su capacidad de reparar el DNA y minimizar cambios por mutaciones (Dhanani y col., 2015). Además, las cepas NTS evaluadas poseen perfiles de resistencia y multiresistencia (principalmente a la familia de amino glucósidos); revelando, que ríos de Culiacán, Sinaloa son fuentes de cepas NTS multiresistentes a antibióticos, y el posible intercambio de genes de resistencia entre diferentes bacterias.

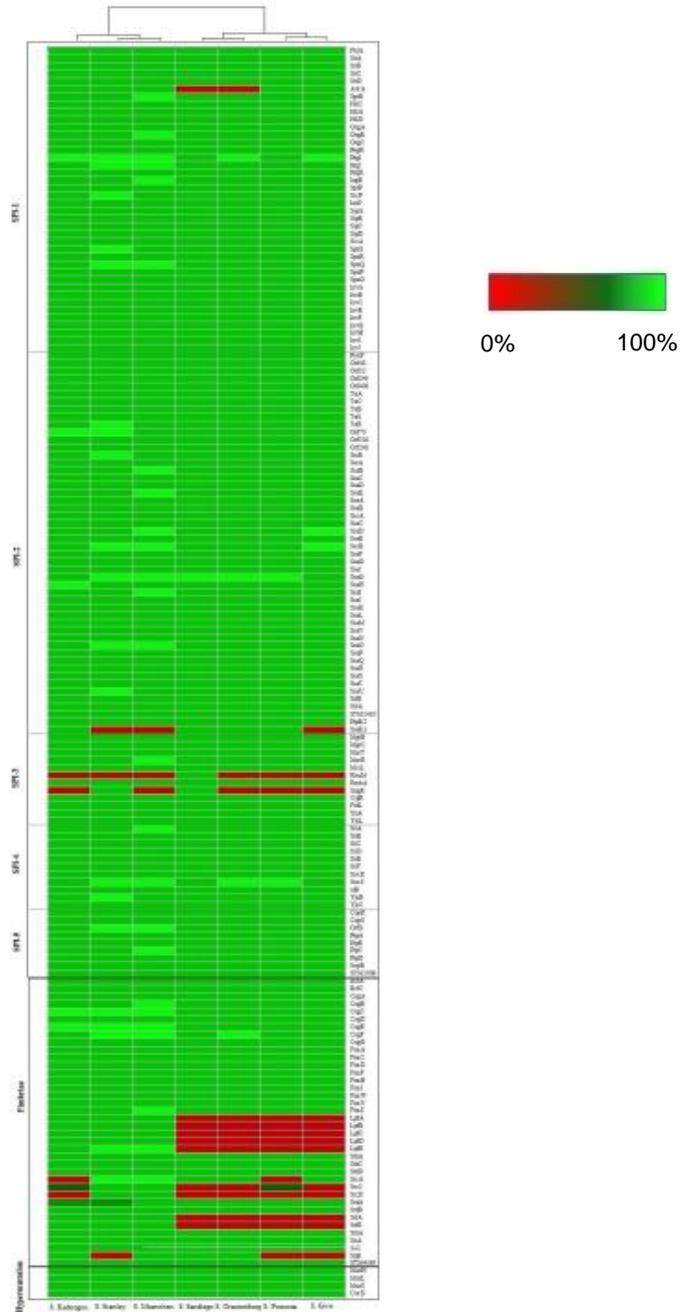


Fig. 16. Factores moleculares de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. El mapa de calor muestra los porcentajes de similitud de SPI 1-5, genes fimbriales e hipermutación obtenidos con el servidor BLASTn y visualizados con la herramienta XLSTAT.

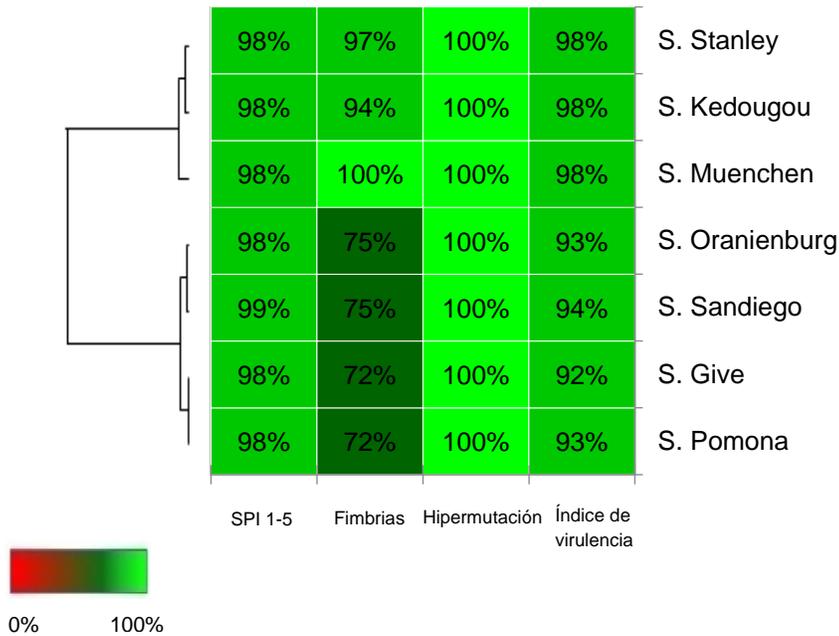


Fig. 17. Índice de patogenicidad de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Los porcentajes del contenido genómico de características genómicas fueron estimados y visualizados en un mapa de calor utilizando la herramienta XLSTAT.

F POTENCIAL PATOGENICO *in vitro*

1 Capacidad de adherencia

La adherencia en células epiteliales intestinales constituye el primer paso durante el proceso de infección de *Salmonella*. Para determinar la capacidad de adherencia *in vitro*, la línea celular epitelial humana Caco-2 fue infectada con las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, y la cantidad de bacteria adherida fue calculada con base al inóculo inicial utilizado. En la **Fig. 18** se presentan los porcentajes de adherencia obtenidos por las cepas en estudio, incluyendo una cepa de referencia patogénica (*S. Typhimurium* ATCC 14028). Al realizar el análisis estadístico (ANOVA), las cepas NTS presentaron porcentaje de adherencia significativamente similar a la cepa patogénica de referencia; a excepción de *S. Give* CFSAN039524, que mostró significativamente mayor porcentaje de adherencia al resto de las cepas, por el contrario *S. Stanley* CFSAN039535 presentó significativamente menor capacidad de adherencia.

En la literatura se han reportado diferentes porcentajes de adherencia principalmente para *S. Typhimurium* en células Caco-2 que van desde el 2.18 % al 29 % (Bendali y col., 2011; Sirsat y col., 2011; Kortman y col., 2012; Gagnon y col., 2013; Dostal y col., 2014). En este estudio se obtuvieron porcentajes de adherencia para *S. Typhimurium* en células Caco-2 de 6.01 %, y entre el 0.92 % y 11.29 % para las demás cepas NTS, lo que coloca los resultados obtenidos dentro de los parámetros previamente reportados en otros trabajos y nos permite ver que la variación de los porcentajes de adherencia no solo se ven afectados

por el origen de la cepa en estudio, también pueden afectarse por las diferentes condiciones en las que se realizan los ensayos de adherencia como el crecimiento de la línea celular utilizada, la fase en crecimiento de la bacteria o la concentración del inóculo, entre otras condiciones (Steele-Mortimer, 2008).

La capacidad de adherencia de *Salmonella* ayuda a su localización en el tracto gastrointestinal, lo cual ocasiona la producción de citocinas pro-inflamatorias que provocan la migración de neutrófilos hacia el interior del lumen intestinal, y como resultado de ello hay una respuesta inflamatoria que a su vez produce diarrea (Khan, 2014). La bacteria se adhiere mediante la interacción entre adhesinas presentes en la superficie de la bacteria y receptores de la membrana de la célula hospedera (Zeiner, 2012). *Salmonella* posee fimbrias Std que están involucradas específicamente en la adherencia de la bacteria a líneas celulares epiteliales del colon como las células Caco-2. Las fimbrias Std se unen específicamente a receptores α (1,2)-fucosa, presentes en la mucosa del colon (Fabrega y Vila, 2013; Juge, 2012; Chessa y col., 2009). La bacteria también utiliza las proteínas efectoras SipB, SipC, SipD y MisL para mediar su adherencia a diferentes células epiteliales (Wagner y Hensel, 2011). Las cuales se encuentran presentes en el genoma de las cepas NTS de acuerdo a nuestro análisis de virulencia *in silico*.

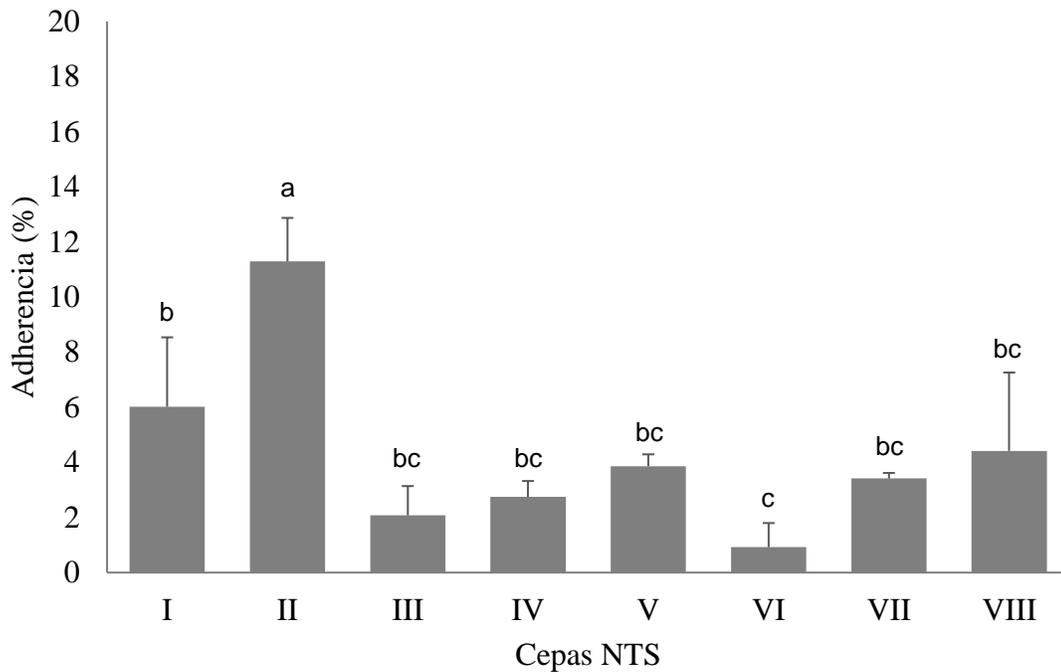


Fig. 18. Capacidad de adherencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2. La línea celular fue infectada con (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Pomona* CFSAN039526, (IV) *S. Muenchen* CFSAN039541, (V) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VI) *S. Stanley* CFSAN039535, (VII) *S. Sandiego* CFSAN039537, (VIII) *S. Oranienburg* CFSAN039536 por 60 min. El porcentaje de adherencia se calculó con respecto al inóculo inicial. Los datos representan los promedios de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

2 Capacidad de invasión

Una vez que la bacteria se ha adherido a células no fagocíticas del epitelio intestinal, desencadena procesos dentro de la célula hospedera que promueven su propia internalización. Para determinar la capacidad de invasión en células epiteliales intestinales de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, células Caco-2 fueron infectadas y los porcentajes de invasión se obtuvieron con base al inóculo inicial aplicado.

Las cepas NTS presentaron menor porcentaje de invasión comparados con la cepa patogénica de referencia utilizada (**Fig. 19**) al realizar el análisis de varianza (ANOVA), se observó diferencias estadísticas en todas las cepas NTS aisladas de agua de río con respecto a la cepa *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Se obtuvieron porcentajes de invasión desde 0.03 % (*S. Stanley* CFSAN039535) hasta 0.89 % (*S. Typhimurium*). En diversos estudios se han reportado porcentajes de invasión para *S. Typhimurium* (Sirsat y col., 2011; Gagnon y col., 2013; Dostal y col., 2014), los resultados obtenidos se encuentran dentro de parámetros previamente reportados en la literatura.

Para invadir células no fagocíticas, *Salmonella* utiliza el T3SS-1 para traslocar proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula hospedera, y con ello producir reordenamientos del citoesqueleto de actina que producen ondulaciones de la membrana celular que rodean e internalizan a la bacteria (Fabrega y Vila y col., 2013). Factores moleculares que se encuentran dentro del genoma de las cepas NTS, de acuerdo a la virulotipificación *in silico*. Algunos de estos genes

traslocados al citoplasma de la célula hospedera, regulan la activación de la SPI-1, requerida para el proceso de invasión, *hilA*, *hilC*, y *hilD* (Troxell y col., 2010). Además, las cepas NTS poseen los genes *prgH*, *prgK*, *prgI*, *invG*, *prgJ*, *invK* *spaO* e *invC* que forman la estructura basal del T3SS-1, los genes *sipB*, *sipC* y *sipD* que forman el translocón y la estructura de ajuga, y los genes *invB*, *sicA*, *sigE* y *sicP*, chaperonas que participan en la translocación de proteínas efectoras al citoplasma de la célula hospedera (Moest y Meresse, 2013; Khan, 2014). También poseen genes que codifican proteínas efectoras que inician el proceso de invasión, *sopE*, *sopE2* y *sopB*, así como genes que codifican las proteínas *sipC* y *sipA* que producen reordenamientos del citoesqueleto de la célula hospedera necesario para la internalización de la bacteria (Srikanth y col., 2011; Rosselin y col., 2011). Sin embargo, a pesar de que poseen los genes necesarios para invadir células epiteliales no lo hicieron al mismo nivel que *S. Typhimurium*.

S. Typhimurium se encuentra dentro de los principales serotipos responsable de casos de enfermedad en seres humanos a nivel mundial y nacional (Gutiérrez-Cogco y col., 2000), la infección se limita principalmente al tracto gastrointestinal, provocando gastroenteritis en seres humanos (Broz y col., 2015). Por esto, no es raro que *S. Typhimurium* presente una capacidad y eficiencia de invasión en células epiteliales superior a los demás serotipos en estudio, ya que este serotipo se encuentra mayormente adaptado al ambiente dentro del hospedero.

Existe una controversia con respecto a la influencia de los ambientes acuáticos en la virulencia de *Salmonella*. Estrada-Acosta y col. (2017)

describieron previamente que las cepas de *S. Orarnienburg* y *S. Saintpaul* expuestas al agua del río tenían propiedades mínimas de adhesión e invasión del huésped. Sin embargo, en otras investigaciones se ha documentado que *Salmonella* al ser expuesta al medio ambiente, factores estresantes podrían potenciar su resistencia y supervivencia y, en consecuencia, mejorar su virulencia (Spector y Kenyon, 2012; Chakroun y col., 2017).

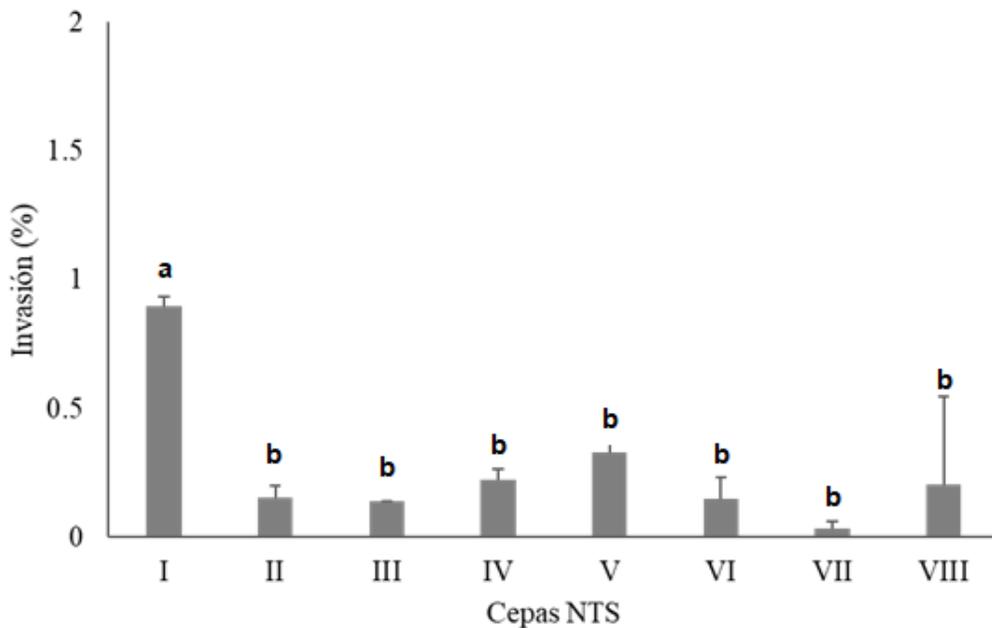


Fig. 19. Capacidad de invasión de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2. La línea celular fue infectada con (I) *S. Typhimurium* ATCC14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Pomona* CFSAN039526, (IV) *S. Muenchen* CFSAN039541, (V) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VI) *S. Stanley* CFSAN039535, (VII) *S. San Diego* CFSAN039537, (VIII) *S. Oranienburg* CFSAN039536 por 60 min. El porcentaje de invasión se calculó con respecto al inóculo inicial. Los datos representan los promedios de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

3 Eficiencia de invasión

El ciclo de patogenicidad de *Salmonella* consiste en una serie de etapas (adherencia, invasión, supervivencia intracelular, daño al hospedero) consecutivas que concluyen con el desarrollo de la enfermedad. La eficiencia de invasión es una manera de representar el porcentaje de bacteria adherida que continua con el ciclo de patogenicidad e invade la célula a la que se adhirió. En la **Fig. 20** se observa que las cepas NTS *S. Stanley*, *S. Kedougou* y *S. Pomona* mostraron eficiencia de invasión estadísticamente similar a *S. Typhimurium*, mientras que el resto de las cepas presentaron significativamente menor eficiencia de invasión. Es importante resaltar que *S. Stanley* fue la cepa NTS con mayor porcentaje de eficiencia de invasión.

Aunque se ha reportado cepas de *Salmonella* que causan brotes diarreicos poseen gran capacidad de adherencia y baja capacidad de invasión (Ramírez y col., 2018); la capacidad invasiva es una etapa muy importante en el ciclo patogénico de la bacteria por que le permite persistir, y sobrevivir en el hospedero.

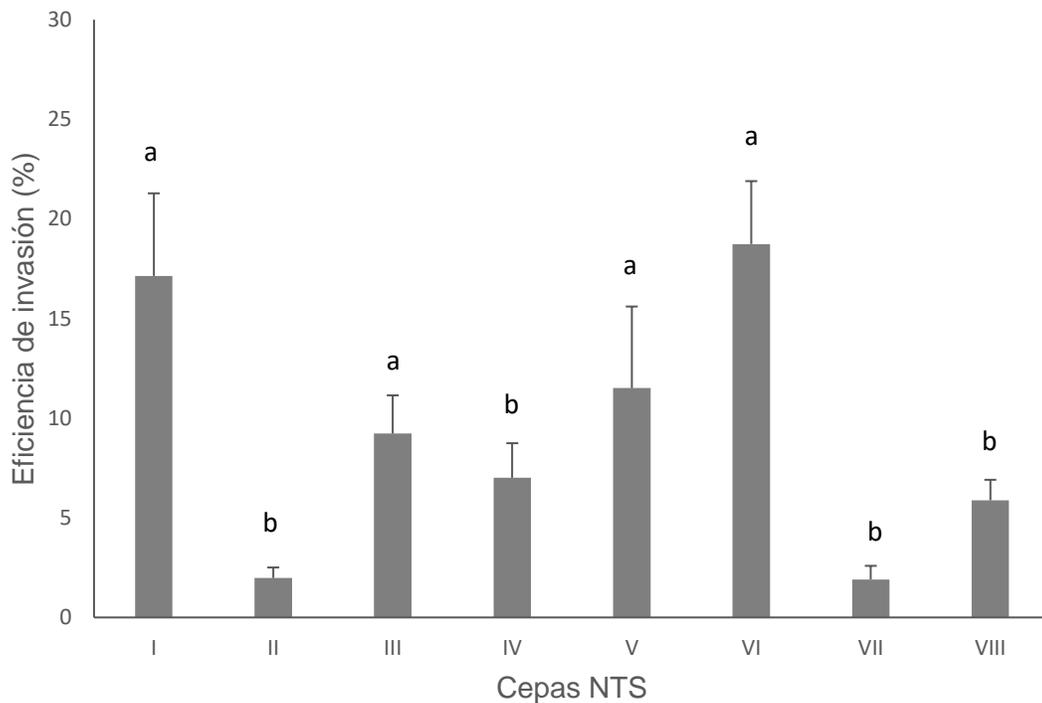


Fig. 20. Eficiencia de invasión de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en células Caco-2. La línea celular fue infectada con (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Pomona* CFSAN039526, (IV) *S. Muenchen* CFSAN039541, (V) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VI) *S. Stanley* CFSAN039535, (VII) *S. Sandiego* CFSAN039537, (VIII) *S. Oranienburg* CFSAN039536 por 60 min. El porcentaje de eficiencia de invasión se calculó con respecto al número de bacteria adherida y al número bacteria invasiva. Los datos representan los promedios de 3 experimentos independientes con 2 repeticiones. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

4 Supervivencia intracelular

Una vez que *Salmonella* logra superar la barrera epitelial, puede continuar su ciclo infeccioso desarrollando una fase sistémica, para ello debe tener la capacidad de sobrevivir dentro la SCV formadas dentro de células hospederas, incluyendo células del sistema inmune como macrófagos, lo que ayudaría a la diseminación sistémica de la bacteria. Para determinar la capacidad de supervivencia intracelular de las cepas NTS en estudio, macrófagos RAW 264.7 fueron infectados y se determinó el número de bacteria superviviente dentro de los macrófagos después de 1, 3, 6, 24 y 48 h.

Antes de realizar las infecciones, los macrófagos fueron estimulados con LPS para asegurarnos que se encontraban en condiciones óptimas para llevar a cabo los procesos de defensa contra las bacterias (**Fig. 21**). Los macrófagos sin estimular presentaron una morfología esférica u ovoidea (**Fig. 21a**), pero después de 24 h en contacto con 10 ng/mL de LPS, las células presentaron una morfología típica de macrófagos activados, con prolongaciones en su membrana (**Fig. 21b**) como lo descrito por Wisner y col. (2011).

Al infectar la línea celular de macrófagos RAW 264.7, *S. Pomona* mostró menor número de bacteria superviviente comparada con el resto de las cepas en estudio. Por el contrario, *S. Muenchen* mostró mayor capacidad de supervivencia (**Fig. 22**). Al realizar el ANOVA se observaron diferencias significativas entre serotipos, al igual que entre los tiempos de infección. Estadísticamente, las cepas *S. Muenchen*, *S. Kedougou*, *S. Oranienburg* y *S. Stanley* tuvieron

significativamente mayor capacidad de supervivencia intracelular comparadas con el resto de las cepas NTS aisladas de agua de río, pero fueron similares a *S. Typhimurium* (**Fig. 23**). El número de bacteria superviviente, para todas las cepas incluidas en este estudio, fue estadísticamente mayor a las 24 h después de haber iniciado la infección de los macrófagos (**Fig. 24**). Aunque las bacterias disminuyeron su concentración a partir de las 48 h, el número de bacteria continua siendo mayor que al inicio de la infección (**Fig. 25**).

Algunos autores como Spector y Kenyon (2012) señalan que *Salmonella*, durante las primeras horas de exposición a un nuevo ambiente, regula la expresión de genes en respuesta a las condiciones de estrés en las que se encuentra; después de 24 h de exposición, el metabolismo bacteriano se modifica y con ello lograr una mejor adaptación al ambiente en el que se encuentra; algunas condiciones de estrés que ocasionan esto es la limitación de nutrientes y pH ácidos, condiciones se puede encontrar dentro de macrófagos. Esto coincide con Medrano-Félix y col. (2017) quien encontró una mayor utilización de fuentes alternativas de carbono después de 12 h de encontrarse bajo limitaciones de nutrientes. A lo que se puede atribuir que el mayor número de bacteria intracelular fue significativamente mayor a las 24 h de infección.

Para lograr sobrevivir dentro de células hospederas como macrófagos, *Salmonella* utiliza genes que se encuentran en la SPI-2 (Wisner y col., 2011).

La expresión de genes pertenecientes a la SPI-2 puede ser regulada por condiciones ambientales a las que se ve expuesta la bacteria; la SCV es

considerada un ambiente con limitada disposición de nutrientes. El hecho de que *Salmonella* se multiplique dentro de ella, indica una adaptación por parte de la bacteria (Deiwick y col., 1999; Dandekar y col., 2015).

Deiwick y col. (1999) estudiaron la regulación de la expresión de SPI-2 bajo diferentes condiciones ambientales, encontrando que la inanición por falta de fosfatos estimula la expresión de genes codificados en la SPI-2. Por su parte, Dandekar y col. (2015) señalan que *Salmonella* utiliza fuentes alternativas de carbono para poder sobrevivir y multiplicarse dentro de macrófagos; dentro de la SCV, la bacteria se encuentra bajo limitación de nutrientes por lo que la utilización de glicerol, ácidos grasos, gluconato, arginina, lactato y N-acetilglucosamina, como fuentes alternativas de carbono, además de glucosa, pueden ayudar a manifestar una infección sistémica.

Medrano-Félix y col. (2017) estudiaron la utilización de fuentes de carbono de *S. Oranienburg* S76 y *S. Saintpaul* S70 aisladas del ambiente después de su interacción con células hospederas (HEp-2). Evidenciando la utilización de fuentes alternativas de carbono, como glucosa, ácido pirúvico, ácido glucosamínico y N-acetyl-D-glucosamina en cepas aisladas de agua de río. El ácido pirúvico es metabolizado por la enzima piruvato deshidrogenasa, según Dandekar y col. (2012), esta enzima ayuda en la expresión de genes de virulencia importantes para la defensa contra intermediarios de oxígeno reactivos (ROI, siglas en inglés), producidos por macrófagos activados.

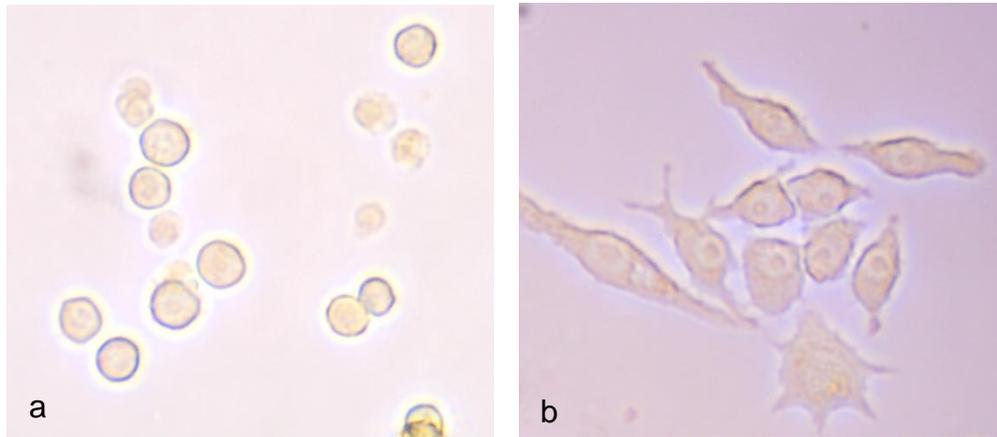


Fig. 21. Morfología de la activación de la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Microscopía óptica (20x) de macrófagos sin estimular (a); después de 24 h estimulados con 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) se observan prolongaciones citoplasmáticas (b) que muestran la activación de células fagocíticas.

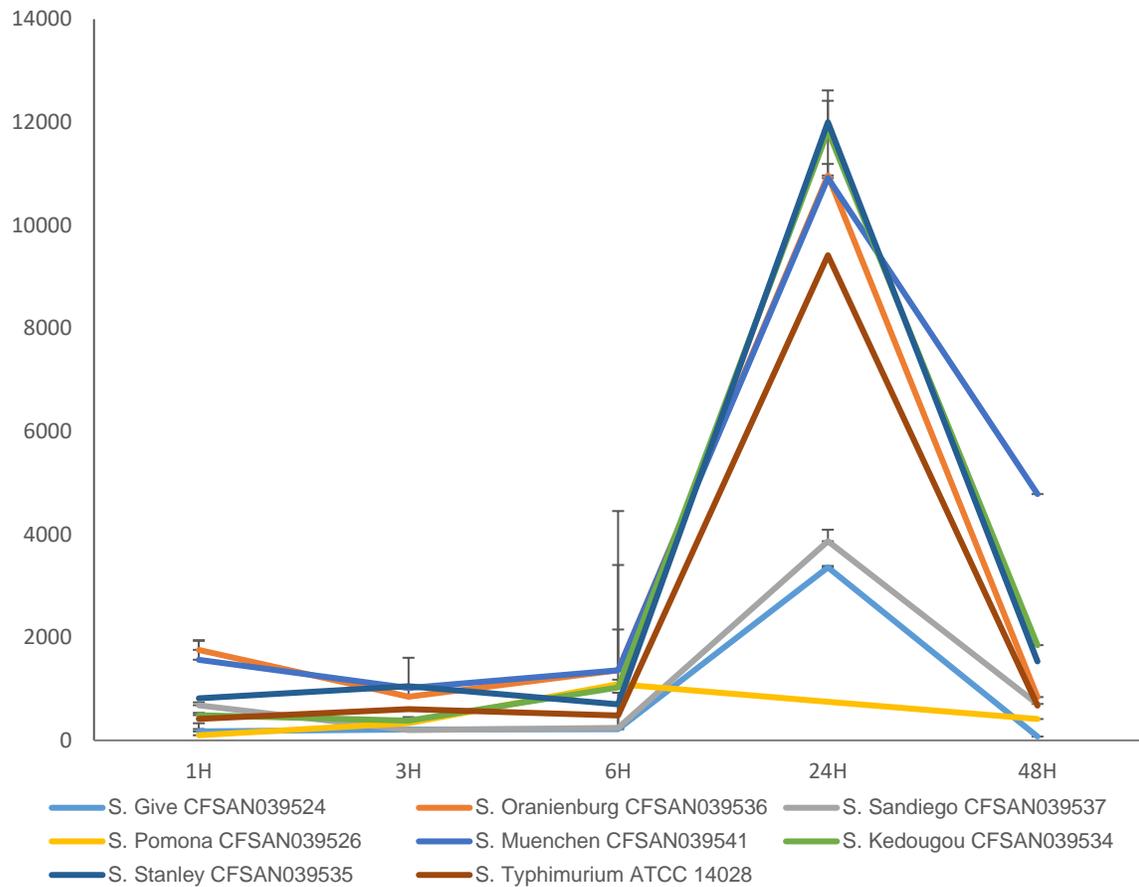


Fig. 22. Cinética de supervivencia intracelular de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7. La línea celular fue infectada con las bacterias por 60 min y tratados con gentamicina. La cantidad de bacteria superviviente se evaluó 1, 3, 6, 24 y 48 h después de iniciada la infección. Los datos representan el promedio de UFC/mL \pm EE de tres experimentos independientes.

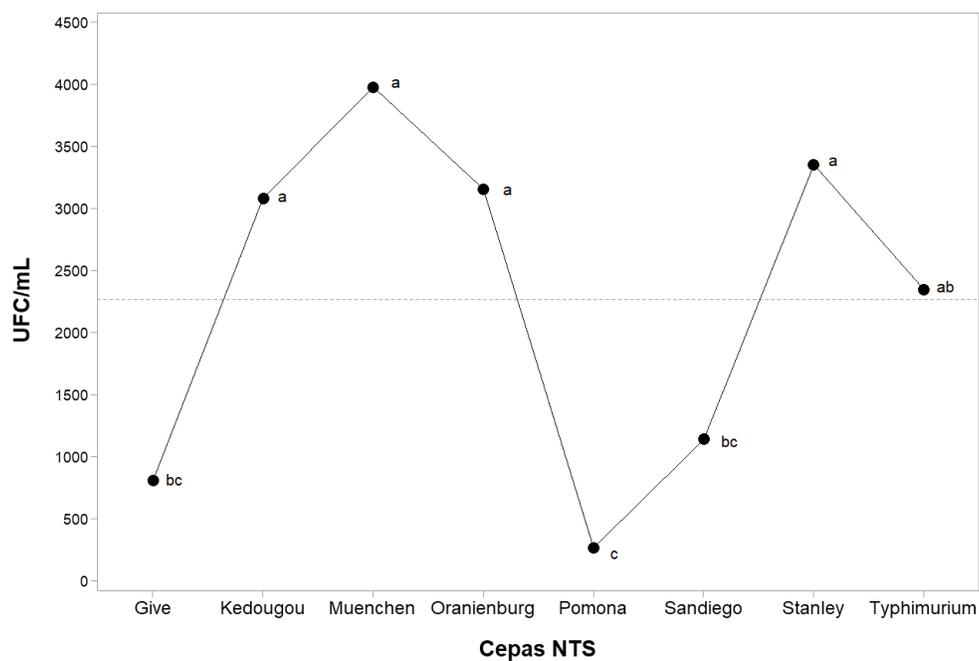


Fig. 23. Efectos principales para la cinética de supervivencia intracelular (UFC/mL) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7. Los valores mostrados son medias de tres experimentos independientes. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

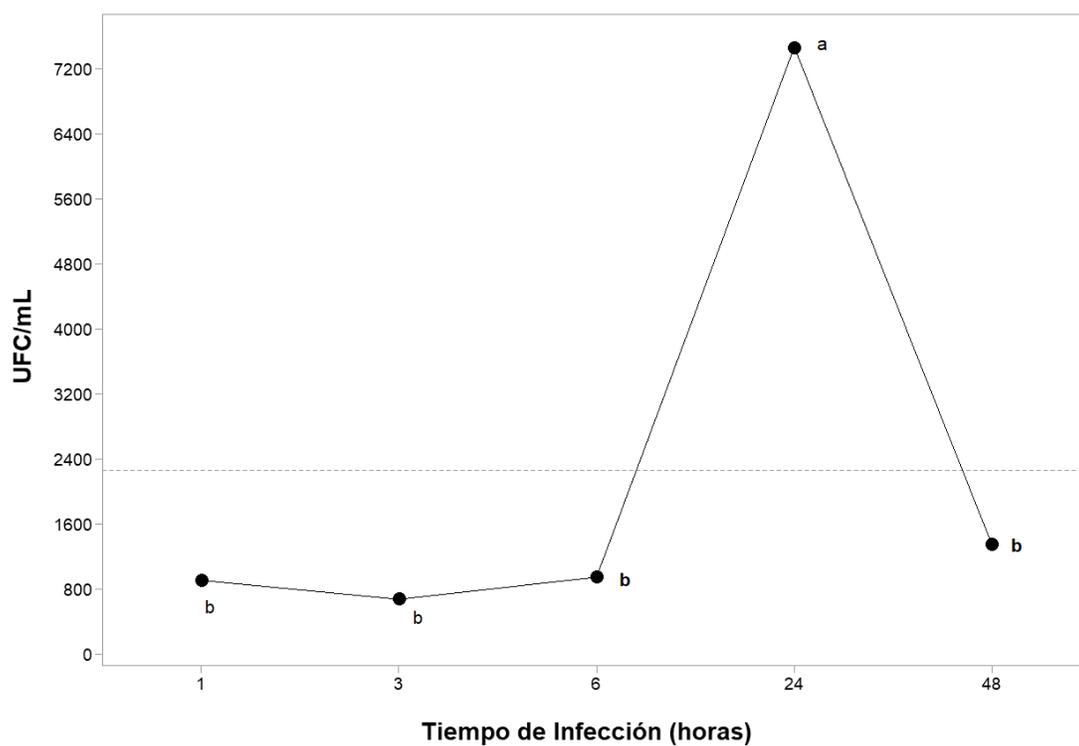


Fig. 24. Efectos principales para la cinética de supervivencia intracelular (UFC/mL) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en diferentes tiempos de infección. Los valores mostrados son medias de tres experimentos independientes. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

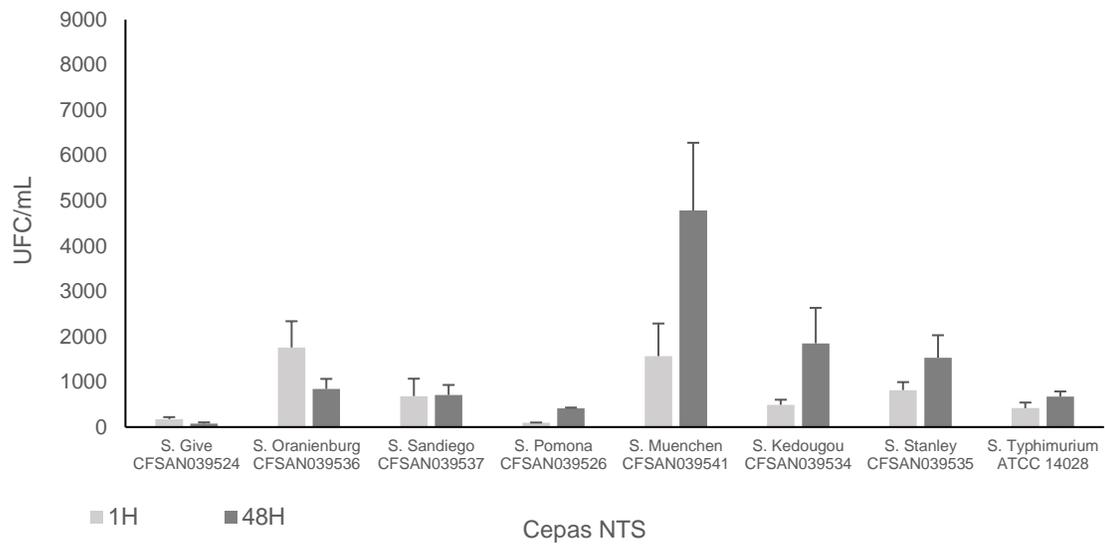


Fig. 25. Comparación entre el primer tiempo de infección (1h) y el tiempo final (48h) de la curva de supervivencia intracelular de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa en macrófagos RAW 264.7.

5 Viabilidad celular

Las células epiteliales son el objetivo principal durante la fase intestinal de la infección con *Salmonella* (Guiney y col., 2005). Para estudiar el daño a las células hospederas causado por *Salmonella*, se determinó la viabilidad de las células epiteliales después de ser infectadas con las bacterias durante 48 h.

Al realizar un análisis estadístico de los porcentajes de viabilidad obtenidos se encontraron diferencias significativas entre las cepas en estudio (**Fig. 26**). Se observó significativamente menor porcentaje de viabilidad en las células Caco-2 infectadas con las cepas *S. Pomona* y *S. Typhimurium*, indicando un mayor daño celular por estas cepas. Las líneas celulares provenientes del epitelio intestinal son ampliamente utilizadas para el estudio *in vitro* de la interacción patógeno-hospedero. La línea celular Caco-2 forma monocapas polarizadas y se diferencia en células con gran homología a enterocitos del epitelio intestinal (Gagnon y col., 2013). Estas células poseen características propias de una célula perteneciente a la barrera intestinal que le confieren mayor resistencia a microorganismos patógenos (Gagnon y col., 2013).

La muerte celular se considera como un mecanismo de defensa por parte de la célula hospedera para tratar de eliminar la infección; sin embargo, se ha reportado que *Salmonella* utiliza varias estrategias que contribuyen a diferentes mecanismos de muerte celular programada (Lamkanfi y Dixit, 2010). El daño celular generalmente ocurre después de una prolongada exposición a la bacteria, habitualmente después de las 12 h de infección (Fábrega y Vila 2013). En el caso

de células epiteliales, la bacteria puede ocasionar la muerte celular mediante algunas proteínas efectoras que producen apoptosis, mientras que en macrófagos producen piroptosis (Fábrega y Vila, 2013).

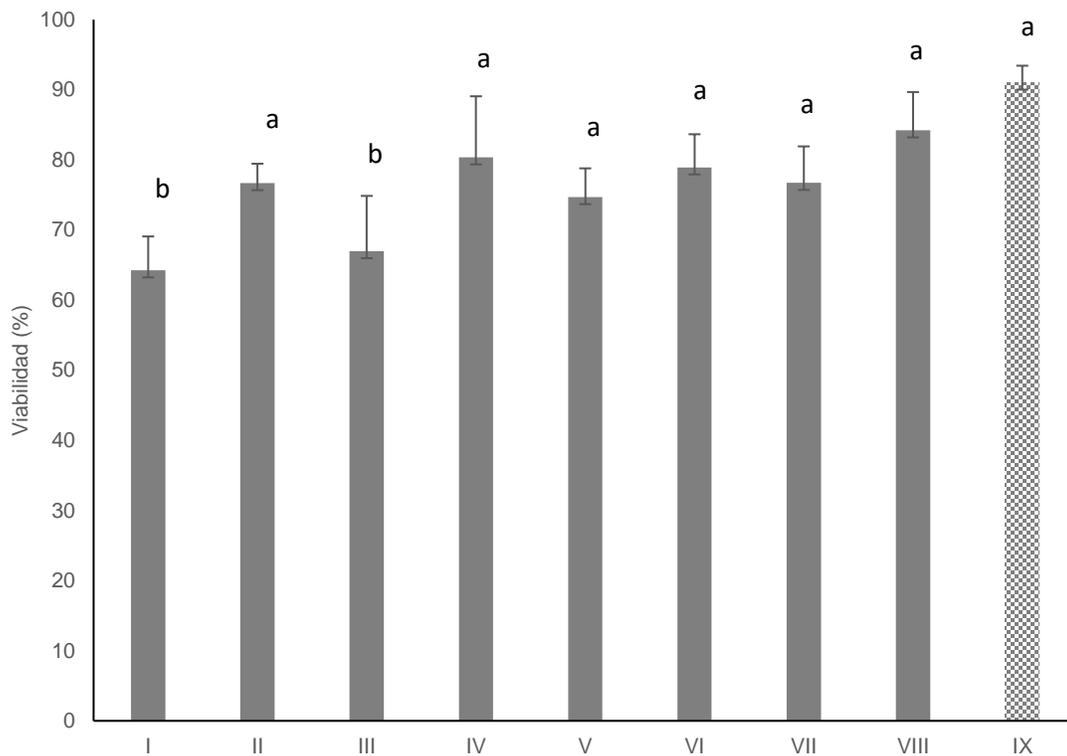


Fig. 26. Viabilidad de la línea celular epitelial humana Caco-2 después de 48 h de infección con cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Las células Caco-2 fueron infectadas con (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Pomona* CFSAN039526, (IV) *S. Muenchen* CFSAN039541, (V) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VI) *S. Stanley* CFSAN039535, (VII) *S. Sandiego* CFSAN039537, (VIII) *S. Oranienburg* CFSAN039536 y como control se incluyeron (IX) células sin infectar. Los datos representan el promedio del % de viabilidad \pm EE de dos experimentos independientes con 2 repeticiones. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

G ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA

Las condiciones óptimas de crecimiento se observan solo cuando los microorganismos se cultivan en el laboratorio. En condiciones óptimas de crecimiento, los microorganismos crecen a su máxima tasa de crecimiento. Sin embargo, la variación en cualquiera parámetro ambiental, afectara el crecimiento y, por lo tanto, representa un factor de estrés; por lo que la respuesta y la supervivencia de las bacterias a la exposición a factores estresantes ambientales se han convertido en un área importante de estudio en microbiología.

En los ensayos fenotípicos de evaluación de estrategias de supervivencia en ambientes estresantes, se observó diversidad (diferencias estadísticas $P < 0.05$) en la respuesta de supervivencia entre las cepas NTS evaluadas, lo cual se observó en todos los ensayos, exceptuando en la exposición a pH ácido. Estas condiciones de supervivencia son principalmente encontradas cuando la bacteria entra al hospedero a través de la ingesta y dentro del fagolisosoma en células fagocíticas (Behnsen y col., 2015). Sin embargo, la supervivencia en agua, suelo y ambientes no hospederos puede representar un desafío similar; la respuesta a estas condiciones no solo afecta el crecimiento y la supervivencia; sino que también puede tener un efecto significativo en la virulencia y la resistencia a múltiples antimicrobianos (Retamal y col., 2015; Spector y Kenyon, 2012).

1 Supervivencia a peróxido de hidrogeno

En la evaluación de la supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río al ser expuestas a peróxido de hidrogeno (H_2O_2) se observó diferencias significativas entre las cepas (**Fig. 27**). *S. Typhimurium* 14028 (97.50 %) presentó el mayor porcentaje de supervivencia, seguida de *S. Pomona* CFSAN039526 (90.00 %) y *S. Oranienburg* CFSAN039536 (88.50 %); por el contrario *S. Stanley* CFSAN039535 presento el menor porcentaje de supervivencia (61.00 %).

Salmonella están expuestas a una gran cantidad de agentes oxidantes cuando pasan a través de ambientes hospederos y no hospederos. En presencia de oxígeno, las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se originan a partir del metabolismo aeróbico endógeno o como parte de un ataque de células (fagocíticas) del sistema inmunológico. Estos compuestos reaccionan fuertemente con moléculas orgánicas causando daño a ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos, y sin mecanismos de protección, las células bacterianas sucumbirían rápidamente a la acumulación de daño oxidativo. En consecuencia, los serotipos de *Salmonella* han desarrollado varias estrategias moleculares para evitar el estrés oxidativo (Spector y Kenyon, 2012).

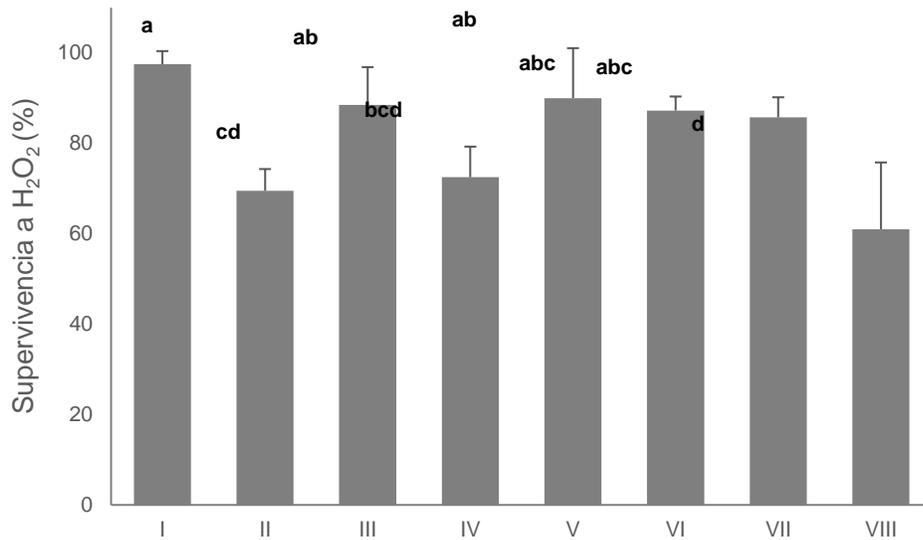


Fig. 27. Supervivencia a la exposición a peróxido de hidrógeno de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (IV) *S. Sandiego* CFSAN039537, (V) *S. Pomona* CFSAN039526, (VI) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VII) *S. Kedougou* CFSAN039534 y (VIII) *S. Stanley* CFSAN039535. Los datos representan el promedio del % de supervivencia \pm DE. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

2 Supervivencia a nitrito de sodio

En la exposición de cepas NTS aisladas de agua de río a nitrito de sodio (NaNO_2), se observó diferencias significativas entre los porcentajes de supervivencia de las cepas evaluadas (**Fig. 28**). *S. Typhimurium* 14028 (97.67 %) presentó el mayor porcentaje de supervivencia; por el contrario *S. Muenchen* CFSAN039541 presentó el menor porcentaje de supervivencia (73.89 %).

Bajo condiciones ligeramente ácidas (pH 5.5), el NO_2 se convierte en diversas especies de nitrógeno reactivo (RNS, siglas en inglés), como el ácido nitroso (HNO_2), el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y, el más importante, óxido nítrico (NO) que posee actividad antimicrobiana (Muhlig y col., 2014). Los RNS también juegan un rol crucial en la respuesta inmune del hospedero en la infección por *Salmonella* (Muhlig y col., 2014). Las cepas evaluadas presentaron un gran porcentaje de supervivencia bajo esta condición evidenciando las posibles estrategias de supervivencia a RNS que poseen estas cepas.

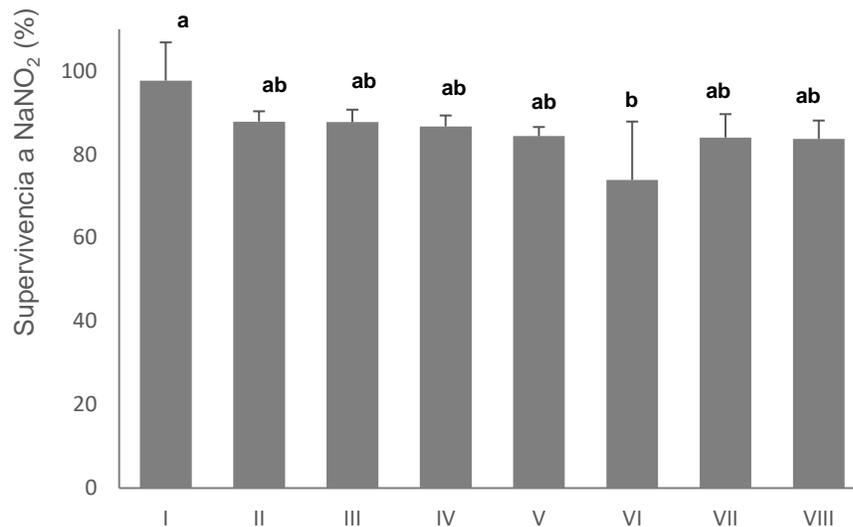


Fig. 28. Supervivencia a la exposición a nitrito de sodio de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (IV) *S. San Diego* CFSAN039537, (V) *S. Pomona* CFSAN039526, (VI) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VII) *S. Kedougou* CFSAN039534 y (VIII) *S. Stanley* CFSAN039535. Los datos representan el promedio del % de supervivencia \pm DE. Diferencias significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes.

3 Supervivencia a pH ácido

Al evaluar la supervivencia a pH ácido (pH 3.0) de las cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, no se observaron diferencias significativas entre las cepas evaluadas (**Fig. 29**). Sin embargo, se observó que todas las cepas, incluyendo la cepa clínica de referencia *S. Typhimurium* 14028, presentaron un porcentaje de supervivencia menor al 58.75 %. Otros trabajos como el realizado por Retamal y col. (2015), reportaron porcentajes de supervivencia a pH ácido por arriba de 100 % a cepas aisladas de hospederos (humanos, aves de corral y aves marinas). Todas las cepas se observaron susceptibles a la exposición a un ambiente ácido. La resistencia al pH ácido es especialmente importante para los patógenos transmitidos por los alimentos que deben sobrevivir al pH ácido del estómago y dentro del fagolisosoma, así como también ambientes ácidos en ciertos alimentos (Spector y Kenyon, 2012).

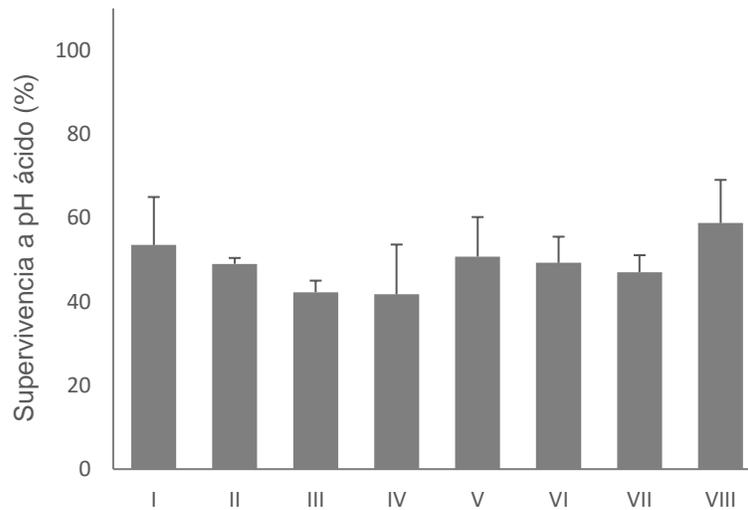


Fig. 29. Supervivencia a la exposición a pH ácido (pH 3.0) de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. (I) *S. Typhimurium* ATCC 14028, (II) *S. Give* CFSAN039524, (III) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (IV) *S. San Diego* CFSAN039537, (V) *S. Pomona* CFSAN039526, (VI) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VII) *S. Kedougou* CFSAN039534 y (VIII) *S. Stanley* CFSAN039535. Los datos representan el promedio del % de supervivencia \pm DE. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

4 Supervivencia a inanición

Al exponer a las cepas NTS aisladas de agua de río a estrés por inanición se encontraron diferencias significativas después de 1 día ($p=0.000$), 2 días ($p=0.000$), 4 días ($p=0.000$) y 8 días ($p=0.000$) de limitación de nutrientes; así mismo, todas las cepas evaluadas no pudieron ser recuperadas mediante conteo en placa a los 16 días (**Fig. 30**). Los porcentajes de supervivencia de todas las cepas fueron disminuyendo en cada uno de los tiempos evaluados, pero evidenciando porcentajes de supervivencia cercanos al 100 %, a excepción de *S. Give* CFSAN039524, que tuvo un marcado aumento de supervivencia (902.10 %) a los dos días de limitación de nutrientes, la cual disminuyó drásticamente a los 4 días. *S. Oranienburg* CFSAN039536 mostró significativamente mayor porcentaje de supervivencia comparada en todos los tiempos evaluados (**Fig. 31, 33 y 34**), exceptuando a los 2 días en donde se observó significativamente mayor porcentaje de *S. Give* CFSAN039524 (**Fig. 32**).

Las cepas provenientes del medio ambiente tienen una mayor exposición a condiciones cambiantes en su entorno durante su ciclo de vida, por lo que poseen mayor capacidad de utilizar una amplia gama de fuentes de C, principalmente el serotipo Oranienburg, como es demostrado por Medrano-Felix y col. (2017).

Además, otros trabajos han reportado que *Salmonella* sigue mostrando su capacidad patogénica *in vitro* e *in vivo*, incluso después de crecer bajo limitación de nutrientes. Yurist-Doutsch y col. (2016), evaluaron la capacidad patogénica de *S. Typhimurium* *in vitro* y en modelos murinos después de ser crecida en medio

con limitación de nutrientes para mimetizar las condiciones de inanición en el tracto gastrointestinal humano. Mostraron que *S. Typhimurium* reducía su habilidad de invadir células epiteliales humanas, sin embargo, su habilidad de replicarse y sobrevivir dentro de dichas células. Además, la capacidad de colonizar el intestino de ratones y los niveles de inflamación gastrointestinal no se vieron afectados por la limitación de nutrientes.

El crecimiento de *Salmonella* en inanición puede provocar un estrés que resulta en la aparición de un estado VBNC en la bacteria (Salive y col. 2020). Por lo que no se puede descartar que después de las 16 horas de limitación de nutrientes las cepas NTS sigan viables, pero no pudieron ser recuperadas mediante conteo en placa.

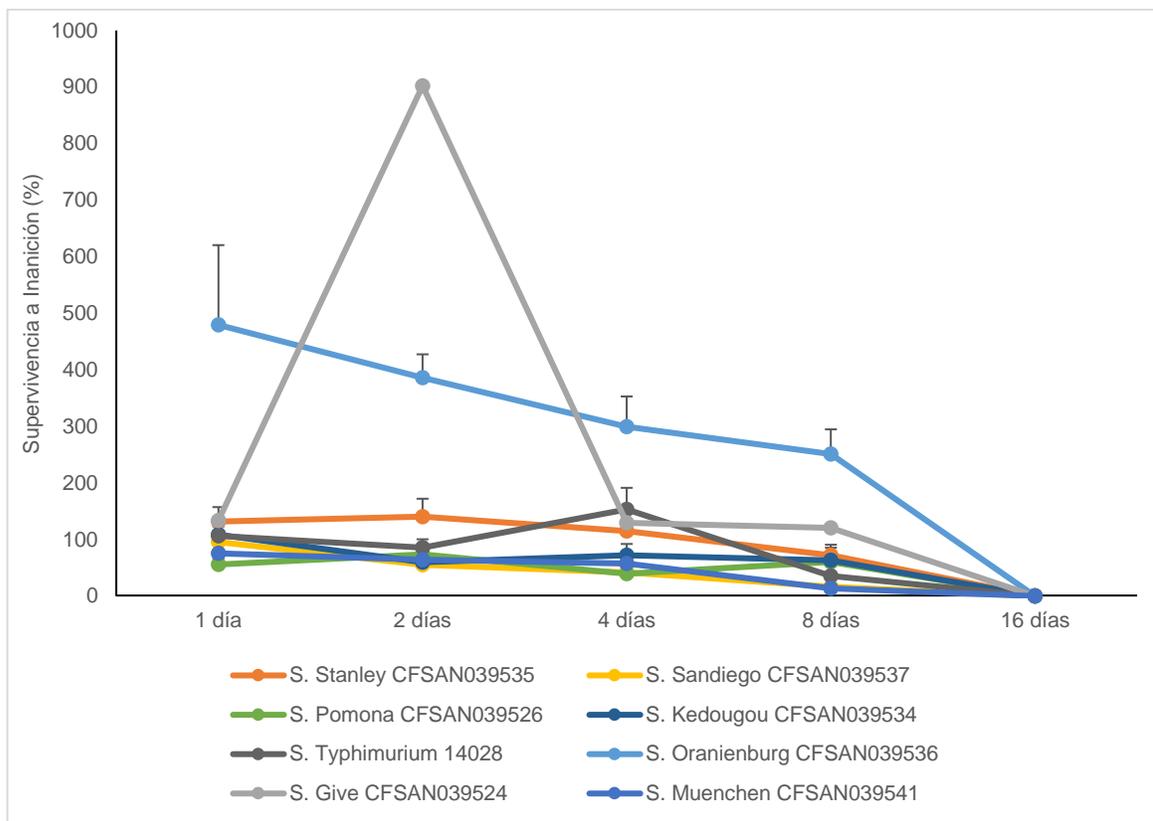


Fig. 30. Supervivencia a inanición de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa. Los datos representan el promedio del % de viabilidad \pm DE.

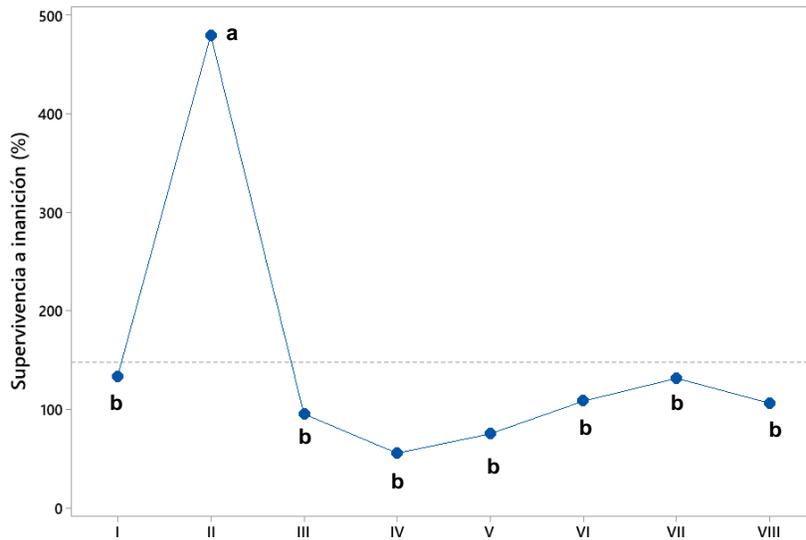


Fig. 31. Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de un día de limitación de nutrientes. (I) *S. Give* CFSAN039524, (II) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (III) *S. Sandiego* CFSAN039537, (IV) *S. Pomona* CFSAN039526, (V) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VI) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VII) *S. Stanley* CFSAN039535 y (VIII) *S. Typhimurium* ATCC 14028. Los datos representan la media de los datos. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

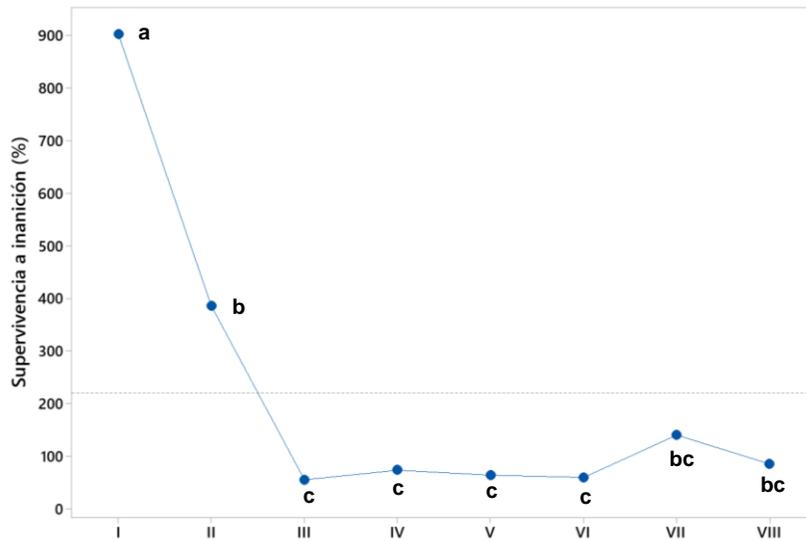


Fig. 32. Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 2 días de limitación de nutrientes. (I) *S. Give* CFSAN039524, (II) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (III) *S. Sandiego* CFSAN039537, (IV) *S. Pomona* CFSAN039526, (V) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VI) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VII) *S. Stanley* CFSAN039535 y (VIII) *S. Typhimurium* ATCC 14028. Los datos representan la media de los datos. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

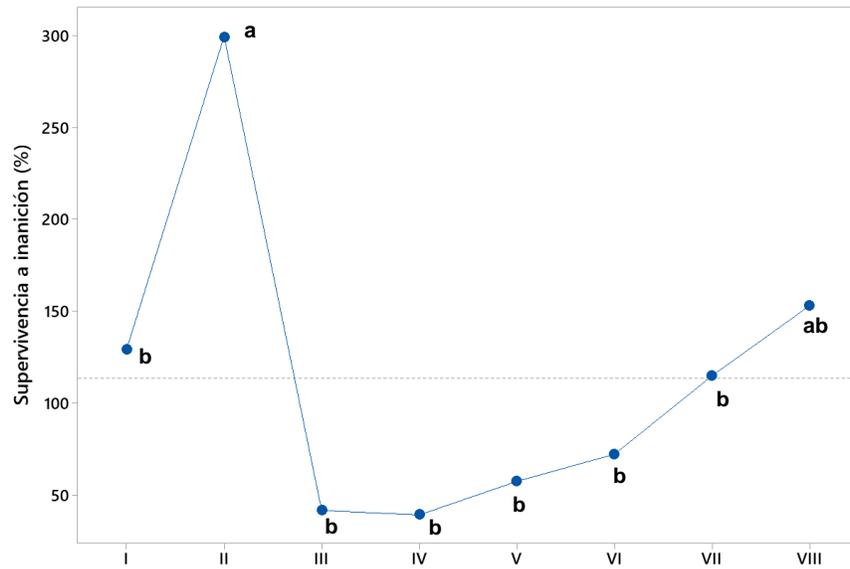


Fig. 33. Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 4 días de limitación de nutrientes. (I) *S. Give* CFSAN039524, (II) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (III) *S. Sandiego* CFSAN039537, (IV) *S. Pomona* CFSAN039526, (V) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VI) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VII) *S. Stanley* CFSAN039535 y (VIII) *S. Typhimurium* ATCC 14028. Los datos representan la media de los datos. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

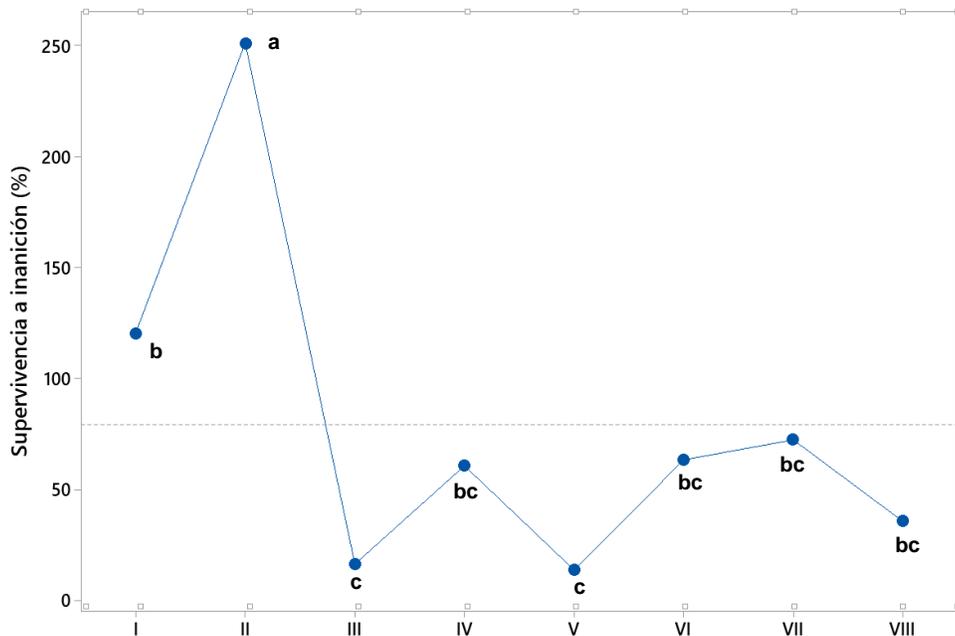


Fig. 34. Supervivencia de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa después de 8 días de limitación de nutrientes. (I) *S. Give* CFSAN039524, (II) *S. Oranienburg* CFSAN039536, (III) *S. Sandiego* CFSAN039537, (IV) *S. Pomona* CFSAN039526, (V) *S. Muenchen* CFSAN039541, (VI) *S. Kedougou* CFSAN039534, (VII) *S. Stanley* CFSAN039535 y (VIII) *S. Typhimurium* ATCC 14028. Los datos representan la media de los datos. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

IX CONCLUSIONES

1. Los siete genomas de las cepas NTS aisladas de agua de río fueron registrados en las bases de datos de GenBank, GOLD e IMG. Los tamaños de los genomas oscilaron entre 4.61 a 5.12 Mb. Las diferencias del contenido genómico corresponden con el tamaño del genoma. El análisis filogenético muestra a las cepas evaluadas dentro de *S. enterica subsp. enterica*. El mayor aporte al pangenoma fue hecho por las cepas NTS aisladas de agua de río, particularmente por las cepas Give, Kedougou y Pomona.
2. La virulotipificación indica una propiedad relativamente estable (92-98 %) de acuerdo a los genes evaluados. El fenotipo de virulencia es reflejo de su virulotipo. Las cepas NTS difieren en el grado de adherencia, pero muestran esta propiedad similar al control, la cepa Give mostró mayor capacidad de adherencia, mientras que Stanley presentó menor adherencia. La capacidad invasiva se mostró estable entre las cepas aisladas de agua y diferentes a la cepa control. Observamos que todas las cepas NTS evaluadas pueden adherirse e invadir células Caco-2. Las cepas NTS tuvieron su máxima cuenta de supervivencia intracelular en macrófagos RAW 264.7 a las 24 h, siendo las cepas Oranienburg, Stanley, Muenchen y Kedougou, junto con Typhimurium las que mostraron mayor capacidad de supervivencia intracelular. Solo las Typhimurium y Pomona mostraron significativamente mayor capacidad de causar daño al hospedero, con respecto a células sin infectar. En la evaluación de las estrategias de supervivencia se observó diversidad entre las cepas en la exposición a H₂O₂,

NaNO₂ e inanición, pero no en pH ácido en donde no se encontraron diferencias entre las cepas.

3. El análisis genómico proporcionó información sobre el papel potencial de las cepas de NTS transmitidas por el agua en México y la necesidad de estudiar *Salmonella* en las fuentes de agua. Los datos recopilados en este estudio evidencian los factores moleculares que respaldan las propiedades metabólicas y de virulencia de cepas NTS.

4. El perfil genotípico y fenotípico de cepas NTS aisladas de agua de río en Culiacán, Sinaloa, sugiere que el agua de río es fuente de bacterias que son potencialmente patogénicas para organismos, como los seres humanos.

5. Con el aumento gradual de la información científica sobre la estructura genética de las cepas de *Salmonella*, será posible contar con herramientas valiosas para explorar y comprender mejor la microbiología básica y la genómica de esta bacteria y su impacto en la salud pública.

X BIBLIOGRAFÍA

- Achtman M, Wain J, Weill F-X, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, y Brisse S. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog 8(6): e1002776.
- Altier C, Suyemoto M, y Lawhon SD. 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion genes by csrA. Infection and immunity. 68 (12):6790.
- Altier C. 2005. Genetic y environmental control of *Salmonella* invasion. The Journal of Microbiology. 43 (S):85-92.
- Álvarez-Ordóñez A, Fernández A, Bernardo A, y López M. 2010. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. Food Microbiology, 27, 44–49.
- Álvarez-Ordoñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, y Hill C. 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. Microbiology. 157:3268-3281.
- Arellano AO, Betancourt LM, Aguilar ZG, Ponce de Leon HC. 2017. Agrochemical loading in drains and rivers and its connection with pollution in coastal lagoons of the Mexican Pacific. Environ. Monit Assess. 189(6):270.
- Aziz RK, Bartels D, Bestt AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubai M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, WilKe A, y Zagnitko O. 2008. The RAST

- server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 8; 9: 75.
- Bajaj V, Lucas RL, Hwang C, Lee CA. 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* 22:703–714.
- Baxter MA, Fahlen TF, Wilson RL, Jones BD. 2003. HilE interacts with HilD and negatively regulates *hilA* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun.* 71:1295–1305.
- Behnsen J, Perez-Lopez A, Nuccio S-P, Raffatellu M. 2015. Exploiting host immunity: the *Salmonella* paradigm. *Trends in Immunology*, 36(2), 112–120. doi:10.1016/j.it.2014.12.003
- Bendali F, Durand A, Hebraud M. y Sadoun D. 2011. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: an algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. *Journal of food and nutrition research.* 50(3):139-149.
- Broz P, Ohlson MB, Monack DM. 2015. Innate immune response to *Salmonella* Typhimurium, a model enteric pathogen. *Gut Microbes.* 3(2):62-70.
- Bowden SD, Ramachandran VK, Knudsen GM, Hinton JCD y Thompson A. 2010. An Incomplete TCA cycle increases survival of *Salmonella* Typhimurium during infection of resting and activated murine macrophages. *PLoS ONE.* 5(11):e13871. doi:10.1371/journal.pone.0013871

- Castañeda-Ruelas G, Carreón-Gaxiola C, Castelán-Sánchez H, Acatzi-Silva A, Romero-Martínez S, García-Molina A, Jiménez-Edeza M. 2017. Draft genome sequences of 18 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar oranienburg strains isolated from rivers in Northwestern Mexico. *Genome Announc* 5:e01585–e01516.
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). 2011. National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia, EUA. http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf Consultado: 1.Mayo.16.
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). 2014. *Salmonella*. Atlanta, Georgia, EUA. <http://www.cdc.gov/Salmonella/index.html> Consultado: 10.Mayo.16
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). 2013. National *Salmonella* surveillance anual report, 2011. Atlanta, Georgia, EUA. <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/Salmonella-annual-report-2011-508c.pdf> Consultado: 11.Mayo.16.
- Chakroun I, Cordero H, Mahdhi A, Morcillo P, Fedhila K, Cuesta A, Bakhrouf A, Mahdouani K, Esteban M. 2017. Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical *Salmonella* typhimurium infection. *Microb Pathog* 106:40–49.
- Chávez-de la Peña M, Higuera-Iglesias AL, Huertas-Jiménez MA, Báez-Martínez R, Morales-de León J, Arteaga-Cabello F, y Ponce de León-Rosales S. 2001.

- Brote por *Salmonella* enteritidis en trabajadores de un hospital. Salud pública de México, 43 (3): 211-216.
- Chessa D, Winter MG, Jakomin M, y Baumler AJ. 2009. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Std fimbriae bind terminal $\alpha(1,2)$ fucose residues in the cecal mucosa. Molecular Microbiology. 71(4): 864-875.
- Coombes BK, Wickham ME, Lowden MJ, Brown NF, Finlay BB. 2005. Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102:17460 – 17465.
- D' Aoust J-Y, Maurer J, y Bailey JS. 2001. *Salmonella* species. Food microbiology: Fundamentals and frontiers. 2: 141–178.
- Dandekar T, Fiesemann A, Popp J, y Hensel M. 2012. *Salmonella enterica*: a surprisingly well-adapted intracellular lifestyle. Frontiers in microbiology. 3:164.
- Dandekar T, Fiesemann A, Fischer E, Popp J, Hensel M, y Noster J. 2015. *Salmonella*-how a metabolic generalist adopts an intracellular lifestyle during infection. Frontiers in cellular and infection microbiology. 4:191.
- Darling AE, Mau B, y Perna NT. 2010. Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. PLoS One. 5, e11147.
- Darwin KH y Miller VL. 2000. The putative invasion protein chaperone SicA acts together with InvF to activate the expression of *Salmonella* Typhimurium virulence genes. Mol. Microbiol. 35:949 –960.

- Deiwick J, Nikolaus T, Edogan S y Hensel M. 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Molecular Microbiology*. 31 (6):1759-1773.
- den Bakker HC, Switt AIM, Govoni G, Cummings CA, Ranieri ML, Degoricija L, Hoelzer K, Rodriguez-Rivera LD, Brown S, Bolchacova E, Furtado MR, y Wiedmann M. 2011. Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. *BMC genomics*, 12(1), 425.
- de Moraes M, Desai P, Porwollik S, Canals R, Perez D, Chu W, McClelland M, Teplitski M. 2017. *Salmonella* persistence in tomatoes requires a distinct set of metabolic functions identified by transposon insertion sequencing. *J Appl Environ Microbiol*. 83:e03028–e03016.
- DGE (Dirección General Epidemiología). 2014. Anuarios de morbilidad. México. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
Consultado: 11. Abril.16
- DGE (Dirección General Epidemiología). 2010. Boletín de epidemiología. http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html Consultado: 30.Abril.16
- Dhanani A, Block G, Dewar K, Forgetta V, Topp E, Beiko R, Diarra M. 2015. Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens. *PLoS One*.10:e0128773.

- Doolittle RF, Feng DF, Tsang S, Cho G, y Little E. 1996. Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*. 271(5248):470–7.
- Dostal A, Gagnon M, Chassard C, Zimmermann MB, O’Mahony L, y Lacroix C. 2014. *Salmonella* adhesión, invasion and celular immune responses are differentially affected by iron concentrations in a combined *in vitro* gut fermentation-cell Model. *PLoS ONE*. 9 (3):e93549.
- Elemfareji OI, y Thong KL. 2013. Comparative virulotyping of *Salmonella* typhi and *Salmonella* enteritidis. *Indian J Microbiol*. 53(4):410-417.
- Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. 2005. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol*. 57:691–705.
- Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, y Lee LH. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in life science*. 8(3): 284-293.
- Estrada-Acosta M, Medrano-Felix A, Jimenez M, Gomez-Gil B, Leon-Felix J, Amarillas L, Chaidez C. 2013. Draft genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype saintpaul strain S-70, isolated from an aquatic environment. *Genome Announc*. 1:e01016–e01013.
- Estrada-Acosta M, Jiménez M, Chaidez C, León-Félix J, y Castro-del Campo N. 2014. Irrigation water quality and the benefits of implementing good

- agricultural practices during tomato (*Lycopersicon esculentum*) production. Environment Monitoring and Assessment. 186 (7):4323-4330.
- Estrada-Acosta M, Ramirez K, Medrano-Félix J, Castro-Del Campo N, López-Moreno H, Jimenez Edeza M, Martínez-Urtaza J, Chaidez C. 2017. Effect of river water exposition on adhesion and invasión abilities of *Salmonella oranienburg* and Saintpaul. Int J Environ Health Res 28:43–54.
- Fabrega A y Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clinical Microbiology Reviews. 26(2):308-341.
- Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, y Desmarchelier P. 2005. A study of the prevalence and enumeration of *Salmonella entérica* in cattle and on carcasses during processing. Journal of Food Protection. 68 (6): 1147-53.
- Figuroa OIM y Verdugo RA. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Revista latinoamericana de microbiología. 47 (1-2): 25- 42.
- Fricke W, Mammel M, McDermott P, Tartera C, White D, LeClerc J, Ravel J, Cebula T. 2011. Comparative genomics of 28 *Salmonella enterica* Isolates: evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution. J Bacteriol 193:3556–3568.
- Foster JW y Spector MP. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. Annual Review Microbiology.49:145-174.
- Fresno M, Barrera V, Gornall V, Lillo P, Paredes N, Abalos P, Fernández A, y Retamal P. 2013. Identification of diverse *Salmonella* serotypes, virulotypes,

- and antimicrobial resistance phenotypes in waterfowl from Chile. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 13(12).
- Gagnon M, Berner AZ, Chervet N, Chassaard C, Lacroix C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasión. *Journal of microbiological methods*. 94: 274-279.
- Garmendia J, Beuzon CR, Ruiz-Albert J, Holden DW. 2003. The roles of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella* Typhimurium SPI-2 type III secretion system. *Microbiology* 149:2385–2396.
- Gerlach R, Hensel M. 2007. *Salmonella* pathogenicity islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 120:317–327.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF y Darfeuille-Michaud A. 2001. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patientes with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infection and immunity*. 69 (9): 5529-5537.
- González PJ, Pereira SN, Soto VZ, Hernández AE, y Villarreal CJ. 2014. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*. 30(1):73-94.
- Guiney DG. 2005. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 289:131-50.

- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, y González-Andrade M. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud en México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.
- Halder B, Malakar A, Chakraborty S. 2017. Nucleotide composition determines the role of translational efficiency in human genes. *Bioinformatics* 13:46–53.
- Hernández CC, Aguilera AMG, y Castro EG. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31(4):137-151.
- Humphries AD, Raffatellu M, Winter S, Weening EH, Kingsley RA, Droleskey R, Zhang S, Figueiredo J, Khare S, Nunes J, Adams LG, Tsolis RM, y Baumler AJ. 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol. Microbiol.* 48:1357–1376.
- Humphrey T. 2004. *Salmonella*, stress responses and food safety. *Nature review microbiology*. 2:504-509.
- Jacobsen A, Hendriksen R, Aaresturp F, Ussery D, Friis C. 2011. The *Salmonella enterica* Pan-genome. *Microb Ecol* 62:487–504
- Jiménez M, Martínez-Urtaza J y Chaidez C. 2011. Geographical and temporal dissemination of *Salmonella* e isolated from domestic animal host in the Culiacan Valley, Mexico. *Microbial Ecology*. 61 (4):811-820.

- Jiménez M, Martínez-Urtaza J, Rodríguez-Alvárez MX, León-Félix J, y Chaidez C. 2014. Prevalence and genetic diversity of *Salmonella* spp. in a river in a tropical environment in México. *Journal of Water and Health*. 12(4):874-884.
- Juge N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in microbiology*. 20(1):30-39.
- Jurado JR, Arenas MC, Doblaz DA, Rivero A, y Torre-Cisneros J. 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine*. 10(32):3497-501.
- Khan CMA. 2014. The dynamic interactions between *Salmonella* and the microbiota, within the challenging niche of the gastrointestinal tract. *International Scholarly Research Notices*. ID 846049:23. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/846049>
- Kortman GAM, Boleij A, Swinkels DW, Tjalsma H. 2012. Iron Availability Increases the Pathogenic Potential of *Salmonella Typhimurium* and Other Enteric Pathogens at the Intestinal Epithelial Interface. *PLoS ONE* 7(1): e29968.
- Lamkanfi M y Dixit VM. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host y Microbe*. 44-54.
- Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, Friis C, Aarestrup F, Ussery D. 2012. Genomic variation in *Salmonella enterica* core genes for epidemiological typing. *BMC Genom* 13:88
- Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, Guiney DG. 2001. The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 39: 1464–1470.

- Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, y Guiney DG. 2000. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cellular Microbiology*. 2(1):49-58.
- Lin G, Chai J, Yuan S, Mai C, Cai L, Murphy RW, Zhou W y Luo J. 2016. VennPainter: a tool for the comparison and identification of candidate genes based on venn diagrams. *PLoS ONE* 11(4): e0154315.
- Loman NJ, y Pallen MJ. 2015. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Microbiology*. 13 (12): 787.
- López-Cuevas O, León FJ, Jiménez EM, y Chaidez QC. 2009. Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32 (2):119-126.
- López EF, Pescaretti MM, Morero R y Delgado MA. 2012. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath? *Food Research International*. 45:842-851.
- Louis KS, y Siegel AC. 2011. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: Stoddart MJ (ed) *Mammalian cell viability: methods and protocols*, vol 740. Springer, Berlin, pp 7–12.
- Marchelletta RR, Gareau MG, Okamoto S, Guiney DG, Barret KE, y Fierer J. 2015. *Salmonella*-induced diarrhea occurs in the absence of IL-8 receptor (CXCR2)-dependent neutrophilic inflammation. *The Journal of Infectious Diseases*. 212:128-36.

- Markowitz V, Chen I, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y, Ratner A, Jacob B, Huang J, Williams P, Huntemann M, Anderson I, Mavromatis K, Ivanova N, Kyrpides N. 2012. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res* 40:D115–D122.
- Martínez-Urtaza J, Liebana E, Garcia-Migura L, Perez-Piñeiro P, y Saco M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (7):4030-4034.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J y Clifton SW. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413(6858), 852.
- Medrano-Félix A, Estrada-Acosta M, Jiménez M, Gómez-Gil B, León-Félix J, Amarillas L, Chaidez C. 2013. Draft Genome Sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serotype Oranienburg Strain S-76, Isolated from an Aquatic Environment. *Genome Announc*. 1 (6): e01017-13.
- Medrano-Félix A, Estrada-Acosta M, Peraza-Garay F, Castro-del Campo N, Martínez-Urtaza J, Chaidez C. 2017. Differences in carbon source utilization of *Salmonella* Oranienburg and Saintpaul Isolated from river water. *Int J Environ Health Res* 27:252–263.
- Mühlig A, Behr J, Scherer S, Müller-Herbst S. 2014. Stress Response of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Acidified Nitrite. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (20): 6373– 6382.

- Moest TP y Méresse S. 2013. *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Current Opinion in Microbiology*. 16:38-44.
- Mosser DM y Zhang X. 2008. Activation of Murine Macrophages. *Current protocols in immunology*. 83:14.2:14.2.1–14.2.8.
- Mourao J, Novais C, Machado J, Peixe L, Antunes P. 2015. Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:– clones circulating in Europe. *Int J Antimicrob Agents* 45:610–616.
- Nairz M, Schroll A, Haschka D, Dichtl S, Tymoszuk P, Demetz E, Moser P, Haas H, Fang F, Theurl I, Weiss G. 2017. Genetic and dietary iron overload differentially affect the course of *Salmonella* Typhimurium infection. *Front Cell Infect Microbiol* 7:110.
- Ohl ME y Miller SI. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Reviews Med*. 52:259-74.
- Olekhovich IN y Kadner RJ. 2007. Role of nucleoid-associated proteins Hha and H-NS in expression of *Salmonella enterica* activators HilD, HilC, and RtsA required for cell invasion. *J. Bacteriol*. 189:6882– 6890.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, y Thomson NR. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848.
- Pan Z, Carter B, Núñez-García J, AbuOun M, Fookes M, Ivens A, Woodward MJ y Anjum MF. 2009. Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage

- types: analysis of variation in amino acid transport. *Microbiology*. 155, 3200-3213.
- Petkau A, Stuart-Edwards M, Stothard P, Van Domselaar G. 2010. Interactive microbial genome visualization with GView. *Bioinformatics* 26:3125–3126.
- Popoff MY, Bockemuhl J y Gheesling LL. 2003. Supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*. 154 (3): 173-174.
- Porwollik S y McClelland M. 2003. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5 (11): 977–89.
- Ramírez K, Burgueño-Román A, Castro-del Campo N, López-Moreno HS y Chaidez C. 2018. *In vitro* invasiveness and intracellular survival of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment. *Water and Environment Journal*. <https://doi.org/10.1111/wej.12436>
- Reissis Y, García-Gareta E, Korda M, Blunn GW y Hua J. 2013. The effect of temperature on the viability of human mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*. 4:139.
- Retamal P, Fresno M, Dougnac C, Gutierrez S, Gornall V, Vidal R, Vernal R, Pujol M, Barret M, González-Acuña D, y Abalos P. 2015. Genetic and phenotypic evidence of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis human-animal interface in Chile. *Frontiers in Microbiology*. 6:464.
- Romero CR. 2007. *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Ed. Médica Panamericana, 3^{ra} edición. Argentina. 1802 pp.

- Rosselin M, Abed N, Virlogeux-Payant I, Bottreau E, Sizaret P-Y, Velge P, Wiedemann A. 2011. Heterogeneity of type III secretion system (T3SS)-1-independent entry mechanisms used by *Salmonella* Enteritidis to invade different cell types. *Microbiology*. 157, 839-847.
- Salive AFV, Prudêncio CV, Baglinière F, Oliveira LL, Ferreira SO, y Vanetti MCD. 2020. Comparison of stress conditions to induce viable but non-cultivable state in *Salmonella*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51 (20).
- Setta A, Barrow PA, Kaiser P y Jones MA. 2012. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasión and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF-kB signaling and cell cytotoxicity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 146:212-224.
- Senthilraja P y Kathiresan K. 2015. In vitro citotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF-7 cell lines study of marine yeast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 5 (03):080-084.
- Silva-Hidalgo G, Ortiz-Navarrete VF, Alpuche-Aranda CM, Rendón-Maldonado JG, López-Valenzuela M, Juárez-Barranco F, y López-Moreno HS. 2012. Non-Typhi *Salmonella* serovars found in Mexican zoo animals. *Research in Veterinary Science*. 93:1132-1135.
- SINAVE/DGE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología). 2012. Perfil Epidemiológico de las enfermedades

infecciosas intestinales. México, Distrito Federal.

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/Monografias4_Enf_Infecciosas_Intestinales_%20junio12.pdf Consultado:
17.Abril.16

SINAVE/DGE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología). 2012a. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2010. México, Distrito Federal.
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/publicaciones/2012/A_Morta_%202010_FINAL_Junio%202012.pdf Consultado: 17.Abril.16

Sirsat, SA, Burkholder KM, Munthaiyan A, Dowd SE, Bhunia AK, y Ricke SC. 2011. Effect of sublethal heat stress on *Salmonella* Typhimurium virulence. Journal of Applied Microbiology. 110:813-822.

Spector MP y Kenyon WJ. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. Food Research International 45: 455-481.

Srikanth CV, Mercado-Lubo R, Hallstrom K, McCormick BA. 2011. *Salmonella* effector proteins and host-cell responses. Cellular and Molecular Life Sciences. 63:3687-3697.

Steele-Mortimer O. 2008. Infection of epithelial cells with *Salmonella enterica*. Methods in Molecular biology. 431:201-211.

Tariq F, Khalid Q, Sehgal SA, Mannan S, Jamil F. 2016. Possible Roles of the Pseudogenes of *Salmonella* Typhimurium. Pakistan J. Zool. 48(6):1805-1810.

- Thijs IM, De Keersmaecker SC, Fadda A, Engelen K, Zhao H, McClelland M, Marchal K, Vanderleyden J. 2007. Delineation of the *Salmonella* enterica serovar Typhimurium HilA regulon through genome-wide location and transcript analysis. *J. Bacteriol.* 189:4587–4596.
- Tritt A, Eisen J, Facciotti MT, y Darling AE. 2012. An integrated pipeline for de novo assemble of microbial genomes. *PLoS One.* 7, e42304.
- Troxell B, Sikes ML, Fink RC, Vázquez-Torres A, Jones-Carson J, Hassan HM. 2010. Fur negatively regulates hns and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology.* 193(2):497-505.
- Tukel C, Akcelik M, de Jong MF, Simsek O, Tsolis RM, Baumler AJ. 2007. MarT activates expression of the MisL autotransporter protein of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189:3922–3926.
- Vázquez-Garcidueñas MS, Romero-Pérez NL, Figueroa-Aguilar GA, Jaime-Sánchez JL, y Vázquez-Marrufo G. 2014. Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(02), 143-153.
- Vázquez JA, y Berrón S. 2004. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era del internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(2): 113-20.
- Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chausse AM, Grepinet O, Namdari F, Roche SM, Rossignol A, y Virlogeux-Payant I. 2012. Multiplicity of

- Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiology Open*. 1(3): 243-258.
- Wagner C, Hensel M. 2011. Adhesive Mechanisms of *Salmonella enterica*. En Linke D y Goldman A (eds). *Bacterial adhesion. Advances in experimental medicine and biology*. Springer. New York. 17-34.
- Wang CX, Zhu SL, Wang XY, Feng Y, Li B, Li YG, Johnston RN, Liu GR, Zhou J y Liu SL. 2015. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* subspecies arizonae str. RKS2983. *Genomic Sciences*. 10: 30.
- Weitzman JB. 2001. *Salmonella* sequencing. *BioMed Central*. 306: 1 - 2.
- WHO (Organización Mundial de la Salud). 2008. *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. WHO Library ISBN 978 924 1547222.
- Winfield MD y Groisman EA. 2003. Role of non host environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (7):3687.
- Wisner ALS, Potter AA, Koster W. 2011. Effect of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System on *Salmonella* Survival in Activated Chicken Macrophage-Like HD11 Cells. *PLoS ONE* 6(12): e29787.
- Wu S, Li Y, Xu Y, Li Q, Chu Y, Huang R y Qin Z. 2010. A *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid induces rapid and massive apoptosis in infected macrophages. *Cellular and Molecular Immunology*, 7(4), 271.

Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Tupin A, Valdez Y, Antunes LCM, Yen R, y col. 2016.

Nutrient Deprivation Affects *Salmonella* Invasion and Its Interaction with the Gastrointestinal Microbiota. PLoS ONE 11(7): e0159676.

Zeiner SA. 2012. Type 1 fimbrial structure and regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Tesis para maestría en ciencias. Universidad de Iowa. Ciudad de Iowa, Iowa.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
% p/v	Porcentaje peso a volumen
% v/v	Porcentaje volumen a volumen
µg/mL	Microgramos por mililitros
ATR	Respuesta de tolerancia al ácido, siglas en inglés
Aw	Actividad de agua
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineación local, siglas en inglés
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades, siglas en inglés
CO ₂	Dióxido de carbono
COG	Grupos de clusters ortólogos, siglas en inglés
DMEM	Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal bovino, siglas en inglés
GOLD	Base de datos de genomas online, siglas en inglés
H	Horas
IMG	Genomas Microbianos Integrados, siglas en inglés
KEGG	Enciclopedia de Kioto de genes y genomas
LPS	Lipopolisacárido
mg/mL	Miligramos por mililitros
Min	Minutos
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
MOI	multiplicidad de infección, siglas en inglés
MS	MOPS-Buffer salts
NAP	Proteína asociada a nucleótido, siglas en inglés
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, siglas en inglés
ng/mL	Nanogramos por mililitros
Nm	Nanómetros
NTS	<i>Salmonella</i> no tifoidea
OD	Densidad óptica
OMPs	Proteínas de membrana externa, siglas en inglés
PBS	Buffer de fosfato salino, siglas en inglés
Pfam	Familia de proteínas
RAST	Anotación rápida utilizado tecnología de subsistemas, siglas en inglés
rpm	Revoluciones por minuto
SCV	Vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> , siglas en inglés
SDS	Dodecil sulfato sódico

SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SSR	Sistema de respuesta a la escasez de nutrientes, siglas en inglés
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
TSA	Agar soya tripticaseína
TSB	Caldo soya tripticaseína
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFC/mL	Unidades formadoras de colonia por mililitro
VBNC	Viable pero no cultivable, siglas en inglés
WGS	Secuenciación del genoma completo, siglas en inglés