

2021

Potencial de virulencia de aislamientos de *Salmonella enterica* prevalentes en alimentos utilizando el modelo *Drosophila melanogaster*

IIA. María Isabel
López Rivera



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Potencial de virulencia de aislamientos de *Salmonella enterica* prevalentes en alimentos, utilizando el modelo *Drosophila melanogaster*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta

IIA. María Isabel López Rivera

Dirigido por:

Dr. Gerardo M Nava Morales

Co-Director:

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Centro Universitario, Querétaro, Qro. Julio 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos

Potencial de virulencia de aislamientos de *Salmonella enterica* prevalentes en alimentos, utilizando el modelo *Drosophila melanogaster*

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

IIA. María Isabel López Rivera

DIRIGIDA POR

Dr. Gerardo M. Nava Morales

CO-DIRIGIDA POR

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Presidente

Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar
Secretario

Dr. Edmundo Mercado Silva
Vocal

Dra. Minerva Ramos Gómez
Suplente

Dra. María del Pilar Castañeda Serrano
Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Julio 2021
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



María Isabel López Rivera

DEDICATORIA

Habían transcurrido más de 365 días de permanencia en una nueva *sala de moscas*, con ciclos de numerosos y a veces no tantos, pares de ojos rojos y blancos contenidos en frascos con cubierta de algodón para evitar su huida. Pero éste era un día incierto para la domadora, debido a una pérdida abrupta de los *amantes del rocío de vientre negro*. Ella realizó cambios de temperatura, de ambiente, de alimento y algunos otros intentos fallidos. A pesar de que se observaba el famoso y acertado “ritual de apareamiento” por parte de los machos, con el levantamiento del ala izquierda para lograr el cortejo hacia las hembras, no se lograron ovoposiciones visibles, pupas viables, ni eclosiones con éxito por parte de las *mosquitas de la fruta*. Con todos los factores en contra y un escenario desfavorable, esa mañana la domadora llegó a la sala de moscas, dispuesta a intentar una vez más, cualquier acción que pudiera dar esperanza al cultivo; revisó uno a uno todos los frascos, algunos secos y otros sin señales de vida. Totalmente desanimada, levantó el último frasco sin esperar un resultado diferente, y vaya sorpresa que se llevó al observar en éste, más de cincuenta pares de ojos blancos meconionales. La naturaleza estaba actuando y ¡las mosquitas haciendo lo suyo!

A ti, mosquita resiliente, porque a pesar de las adversidades continuas día a día haciendo lo tuyo...

AGRADECIMIENTOS

A la vida, por permitirme andar, por el bienestar, por darme respiros inagotables, por dejarme continuar cada día y maravillarme de lo que hay en presencia, en esencia, a ese poder superior.

A mis padres, por todo su apoyo, sus consejos, por todo lo que hemos luchado y superado como familia, por creer en mí, por alegrarse, preocuparse y por estar orgullosos de lo que hemos logrado, los amo y admiro.

A mi hermana, la pequeña Lulú, por todo tu apoyo, tus consejos, por toda la ayuda y motivación constante, por la bonita sensación de querer ser mejor cada día por ti también.

A Johan, mi “biólogo” favorito y compañero de vida, gracias por apoyarme siempre e impulsarme en este mundo de la ciencia. Por todas las veces que me escuchas, me aconsejas, me enseñas, porque aprendes conmigo también. Por los debates y todos los desvelos; por creer en mí, incluso más de lo que yo lo hago. Por el potencial, y los pocitos tentadores del conocimiento...

A las fulanitas, por todos esos días de laboratorio, por esas largas charlas, comidas, debates, por los círculos de confianza, por las pijamadas científicas, por todos los días de canciones. Porque son el mejor equipo y apoyo que pude encontrar en mis días de posgrado. A Isa Valdespino, Yuri, Fer, Italia e Ile porque los eternos días de trabajo fueron amenos con su compañía, por preocuparse, ayudarme y desvelarse conmigo. A Martitha, porque además, escuchaste pacientemente día con día mis preocupaciones acompañadas de un buen café, gracias por tu empatía, buena vibra, los paseos y toda tu ayuda. A Lupita, por ser mi mentora, por desvelarte conmigo, por estar disponible siempre para resolver o tener más dudas conmigo; por exigirme y confiar en que siempre puedo dar algo más y mejor de mí. A todas, las valoro mucho niñas.

A mis compañeros del laboratorio, y no del laboratorio, que me apoyaron en la etapa experimental. Sarah y Wong por trabajar tanto conmigo a pesar de que fueron días de pandemia, a Wong por cuidar ahora de las mosquitas. A mis niños de servicio y residencias: Rodri, Kari, Irene, Carmen, Juan por su entusiasmo, ayuda e interés en aprender más y más. A Ara, Martitha, Lulú y Johan porque sin importar el día y la hora, estuvieron ayudándome cada uno en su momento. También, a mis amigos que me escucharon, se interesaron y apoyaron con algún consejo Caro López, Marco, Cindy, Anita, Dalia, Ángel gracias por su solidaridad.

A mi comité tutorial por su invaluable apoyo, guía y dirección; al Dr. Mercado, la Dra. Pilar y la Dra. Mine por sus consejos y por ser parte importante en mi formación académica. Al Dr. Riesgo por su esfuerzo y entusiasta participación en este proyecto de investigación. A mi asesor, el Dr Nava, por los retos académicos y hacerme despegar desde -5 hasta 5 en esta etapa académica, además de su incansable apoyo para llevar a cabo este proyecto.

A CONACYT por el apoyo durante mis años de becaria.

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 <i>Salmonella enterica</i>	5
2.1.1 <i>S. enterica</i> en alimentos	8
2.2 Prevalencia de <i>S. enterica</i> en carne de pollo	8
2.3 Contribución de <i>S. enterica</i> en carne de pollo a casos de Salmonelosis en humanos	9
2.4 Mecanismo de infección de <i>S. enterica</i>	11
2.5 Regulación de la inflamación	12
2.6 Factores de virulencia de <i>S. enterica</i>	13
2.6.1 Capacidad de sobrevivencia de <i>S. enterica</i>	16
2.6.2 Mecanismos de invasión de <i>S. enterica</i>	17
2.7 Islas de patogenicidad de <i>Salmonella</i>	17
2.7.1 Isla de Patogenicidad I (SPI-1)	18

2.7.2	Isla de Patogenicidad II (SPI-2).....	18
2.7.3	Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)	19
2.8	Interacción patógeno–hospedero (Patogenia)	19
2.9	Uso de modelos biológicos para el estudio de la interacción patógeno- hospedero	21
2.10	<i>Drosophila melanogaster</i> como sistema modelo	22
2.10.1	Estudios de potencial de virulencia en <i>D. melanogaster</i>	22
2.10.2	Infección con <i>S. enterica</i> en <i>D. melanogaster</i>	25
2.10.3	Respuesta inmunitaria de <i>D. melanogaster</i> ante infección por <i>S. enterica</i> - Péptidos Antimicrobianos (AMPs)	27
3.	JUSTIFICACIÓN.....	29
4.	OBJETIVOS.....	30
4.1	Objetivo General.....	30
4.2	Objetivos específicos.....	30
5.	METODOLOGÍA.....	31
5.1	Establecimiento y mantenimiento del modelo biológico.....	31
5.1.1	Elaboración de alimento para mantenimiento de <i>D. melanogaster</i>	31
5.1.2	Ajuste en la formulación de alimento para infección oral	32
5.1.3	Mantenimiento de cepas: Prueba de ovoposición	32
5.1.4	Método de anestesia	33
5.1.5	Indicador de consumo de inóculo.....	33
5.2	Validación microbiológica de estirpes en <i>D. melanogaster</i>	34
5.3	Estandarización de protocolo para infección oral	34
5.3.1	Selección de cepas para infección oral	34

5.3.2	Preparación de cultivo bacteriano	36
5.3.3	Preparación de inóculo para infección oral	36
5.3.4	Preparación de organismos para infección oral	37
5.3.5	Protocolo de infección oral	38
5.4	Evaluación del comportamiento post-infección.....	38
5.4.1	Ensayo de Sobresalto	39
5.4.2	Ensayo de Supervivencia.....	40
5.4.3	Ensayo de Replicación.....	41
5.4.4	Confirmación molecular de <i>S. enterica</i> contenida en <i>D. melanogaster</i> durante la infección oral.....	42
5.4.5	Ensayo de actividad locomotora	43
5.4.6	Análisis estadísticos	44
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1	. Establecimiento del modelo de infección	46
6.2	Evaluación de condiciones para la infección oral	50
6.2.1	Relación entre la dieta previa a la infección oral y la susceptibilidad en <i>D. melanogaster</i> ante el desafío con <i>S. enterica</i>	50
6.2.2	Relación entre las estirpes <i>yw</i> y <i>ORR</i> y la susceptibilidad del hospedero ante la infección oral con <i>S. enterica</i>	54
6.2.3	Relación entre el sexo de <i>D. melanogaster</i> y su susceptibilidad en la infección oral con <i>S. enterica</i>	57
6.2.4	Efecto del inóculo de <i>S. enterica</i> en la susceptibilidad <i>D. melanogaster</i> en la infección oral.....	59
6.3	Confirmación molecular de <i>Salmonella</i> recuperada en los desafíos orales..	61

6.4 . Efecto de la virulencia de <i>S. enterica</i> en la enfermedad de ORR	63
6.5 Ensayo de conducta como biomarcador de susceptibilidad en <i>D. melanogaster</i> ante la infección con <i>S. enterica</i>	70
7. CONCLUSIONES.....	75
8. PERSPECTIVA.....	76
9. REFERENCIAS	77
ANEXO I. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA.....	105
ANEXO II. Prueba de Ovoposición	107
ANEXO III. Indicador de consumo de inóculo.....	108
ANEXO IV. Muestras seleccionadas para confirmación molecular en desafíos de infección oral con <i>S. enterica</i> en <i>D. melanogaster</i>	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de especies y subespecies de <i>Salmonella</i>	6
Figura 2. Homologías de <i>Drosophila melanogaster</i> con el humano.....	23
Figura 3. Gen <i>16S rRNA</i> . Amplificación ~402 pb.....	62
Figura 4. Gen <i>invA</i> . Amplificación ~437 pb.....	62
Figura 5. Respuesta de sobresalto en ORR	68
Figura 6. Respuesta de sobresalto en ORR (continuación).....	69
Figura 7. Perfil de actividad y sueño	73

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Consumo de inóculo por régimen alimenticio	47
Gráfica 2. Consumo de inóculo <i>S. Typhimurium</i> por estirpe.....	48
Gráfica 3. Consumo de inóculo <i>S. Enteritidis</i> por estirpe.....	49
Gráfica 4 Replicación del patógeno en el hospedero de acuerdo con régimen alimenticio de <i>D. melanogaster</i>	52
Gráfica 5. Efecto de la dieta en la supervivencia de <i>D. melanogaster</i> ante el desafío oral.	53
Gráfica 6. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por estirpes <i>yw</i> y ORR.	55
Gráfica 7. Análisis de supervivencia. Comparación por estirpe.	56
Gráfica 8. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por sexo en ORR.....	57
Gráfica 9. Análisis de supervivencia. Comparación por sexo	58
Gráfica 10. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por inóculo	60
Gráfica 11. Análisis de supervivencia. Comparación por inóculo en desafío de infección.....	61
Gráfica 12. Replicación de <i>S. enterica</i> en ORR.....	63
Gráfica 13. Análisis de supervivencia en ORR	64
Gráfica 14. Respuesta de sobresalto por día posterior a la infección oral	65
Gráfica 15. Gráfica de actividad locomotora	72
Gráfica 16 Indicador de consumo de inóculo.....	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número presente de serovares en cada especie y subespecie de <i>Salmonella</i> , y hospedero.....	7
Cuadro 2. Principales genes de virulencia identificados en <i>S. enterica</i>	14
Cuadro 3. Estudios de infección con enterobacterias en el sistema modelo <i>D. melanogaster</i>	24
Cuadro 4. Cepas activadas empleadas para infección oral.....	35
Cuadro 5. Cepas seleccionadas para ensayo de actividad locomotora.....	35
Cuadro 6. Composición de mezclas para infección oral.....	37
Cuadro 7. Matriz de categorización para sobresalto.....	40
Cuadro 8. Condiciones de amplificación para detección de <i>Salmonella</i>	43
Cuadro 9. Matriz de identificación de <i>Salmonella</i> en confirmación molecular.....	109

RESUMEN

Salmonella enterica es un patógeno de importancia en la salud pública mundial ya que genera más de 94 millones de casos de gastroenteritis y 150 mil muertes al año. Se ha estimado que la principal fuente de este patógeno son los productos cárnicos, entre ellos la carne de pollo. A nivel mundial se han generado sistemas para el monitoreo y control de este patógeno; sin embargo, el potencial de virulencia de estos aislamientos ha sido poco estudiado. En este sentido, el objetivo de este proyecto fue establecer un modelo de infección oral como herramienta que permita evaluar el potencial de virulencia de los aislamientos de *S. enterica* recuperados de carne de pollo. Para cumplir con esta meta, se utilizaron dos estirpes de *D. melanogaster*, *yellow white* (*yw*) y Oregon-R (ORR) para establecer el modelo de infección. En este modelo, se evaluó el efecto de dos regímenes alimenticios (levadura 2% y sin levadura) sobre el consumo de inóculo de *S. enterica*; estos análisis revelaron que la formulación de la dieta no tiene efecto ($p > 0.05$) en el consumo de inóculo bacteriano. También, se evaluó el grado de infección dependiendo del régimen alimenticio, la estirpe y sexo del hospedero; estos resultados revelaron que la estirpe no tiene efecto ($p > 0.05$) en la supervivencia; sin embargo, la dieta ($p < 0.05$) y el sexo de *D. melanogaster* tienen efecto ($p < 0.05$) en el grado de replicación del patógeno. Por último, se observó el desafío oral de *D. melanogaster* con *S. Typhimurium* que posee dos Islas de Patogenicidad (SPI, por sus siglas en inglés)-1 y SPI-2, presentó mayores ($p > 0.05$) índices de morbilidad (80%) y mortalidad (> 40%) que cepas de *Salmonella* que no contienen estas dos SPI (morbilidad, < 20% y mortalidad, < 20%). Los resultados del presente trabajo revelan que el modelo de infección oral con *S. enterica* en *D. melanogaster* podría ser un excelente modelo *in vivo* para elucidar el potencial de virulencia y mecanismo de patogenicidad de *S. enterica*.

Palabras clave: *Salmonella*, *Drosophila melanogaster*, modelo de infección, virulencia

ABSTRACT

Salmonella enterica remains an important cause of human morbidity, mortality, and a major health treat worldwide. This pathogen causes >94 million gastroenteritis cases and >150 thousand deaths per year around the world. *Salmonella* Typhimurium and Enteritidis are the most reported serotypes in humans and meat products, especially poultry, and are considered the main source for humans. Studies about levels prevalence and diversity of *Salmonella* in meat products and produce are common in numerous countries; however, studies about virulence potential of these isolates remain poorly explored. Based on this premise, the main goal of the present project was to establish an invertebrate model to evaluate virulence potential of *Salmonella* isolates obtained from raw chicken meat. To accomplish this goal, a series of infection experiments were carried out using two *Drosophila melanogaster* strains (*yw*, *yellow white* and ORR, Oregon-R). First, an experiment was carried out to evaluate the effect of two dietary formulations, supplemented with yeast (2%) or without yeast (0%), on *Salmonella* inoculum consumption. No differences ($p > 0.05$) in inoculum consumption were observed between groups. Also, it was revealed that the fly strains of *D. melanogaster* has no effect ($p > 0.05$) in the level of *Salmonella* infection; in contrast, diet and gender are two factors affecting significantly ($p < 0.05$) the degree of proliferation by this pathogen in the fly model. Finally, the present study also revealed that oral challenge of *D. melanogaster* with *S. Typhimurium* harboring Pathogenicity Island (SPI)-1 and SPI-2 induced higher levels of morbidity (80%) and mortality (> 40%) than the challenge with *Salmonella* strains lacking these two SPI (morbidity < 20% and mortality < 20%). Overall, the results of the present study revealed that oral infection model in *D. melanogaster* could be an excellent in vivo tool to evaluate the virulence potential of *Salmonella* strains.

Keywords: *Salmonella*, *Drosophila melanogaster*, meat, infection model, virulence.

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella es una bacteria intracelular anaerobia facultativa, que genera a nivel mundial más de 94 millones de casos de gastroenteritis y más de 155,000 defunciones al año (Jajere, 2019; OMS, 2019). Los principales serotipos que afectan a humanos son *S. enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium y *S. Enteritidis* (Kang et al., 2018; Litvak et al., 2019) y se ha estimado que la principal fuente de infección son los alimentos como pollo, huevo, leche, y vegetales (Kang et al., 2017; CDC, 2019). En Estados Unidos se han reportado prevalencias por encima del 10% en carne de pollo, mientras que en Europa dichas prevalencias son cercanas al 30% (Kang et al., 2017; NARMS, 2017).

A pesar de que *Salmonella* sp. ha sido estudiada por décadas, aún se requiere información sobre el grado de riesgo e impacto de estas prevalencias en el consumidor final (Cox et al., 2011). Además, se desconoce el efecto de su extensa diversidad genética sobre la virulencia, resistencia y propagación del patógeno (Nuccio & Bäumlér, 2014), sin dejar de lado la necesidad de estudios sistemáticos sobre el proceso patobiológico durante la colonización e infección de *Salmonella* sp. en el hospedero (Cosby et al., 2015; Verma & Srikanth, 2015).

Para estudiar la interacción patógeno – hospedero, pueden utilizarse organismos modelo validados (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Dictyostelium discoideum* y *Drosophila melanogaster*) (Verma & Srikanth, 2015). Entre estos modelos, *D. melanogaster* ofrece múltiples ventajas como: tiempo generacional corto, fácil reproducción, bajo costo de mantenimiento, disponibilidad de repositorio de mutantes genéticas (>60,000 variantes) y numerosas bases genómicas (Igboin et al., 2012; BDSC, 2017; Kenmoku et al., 2017; Droid, 2018; Mondotte et al., 2018; FlyBase, 2019). Además, este organismo posee un sistema inmunológico basal conservado, que es homólogo al que presentan los mamíferos (Apidianakis & Rahme, 2009; Buchon et al., 2014; Khalil et al., 2015).

Para conocer el potencial de virulencia de las cepas de *S. enterica* recuperadas de carne de pollo se realizaron estudios de interacción patógeno – hospedero, usando a *Drosophila melanogaster* como sistema modelo. En primer lugar, se establecieron condiciones de alimentación e infección oral con cepas causantes de morbilidad en humanos. Además, se evaluó el comportamiento del hospedero infectado (*D. melanogaster*) con parámetros de morbilidad y mortalidad en relación al sexo y la replicación del patógeno (*S. enterica*) en el hospedero posterior a la infección. Este sistema permitirá identificar la contribución de genes de virulencia en la colonización e infección de *S. enterica*, así como el potencial de virulencia de los aislamientos de *S. enterica* prevalentes en los alimentos para establecer estrategias más efectivas de prevención y control.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Salmonella enterica*

Salmonella, bacilo móvil que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria anaerobia facultativa (Litvak et al., 2019), Gram-negativa, oxidasa negativa y catalasa positiva, que produce gas a partir de D-glucosa, utiliza citrato como fuente de carbono y no es formadora de esporas (Cabral, 2010). Las células de *Salmonella* presentan medidas entre 2 a 5 µm de largo por 0.5 µm de ancho y el tamaño de su genoma varía de 4460 a 4857 kb (Gut et al., 2018).

La temperatura óptima del crecimiento de *Salmonella* es de 37°C, aunque se ha reportado que puede sobrevivir en rangos de temperatura desde 2°C hasta 54°C (Adley & Ryan, 2016). Su hábitat principal, es el tracto intestinal de humanos y animales (Cabral, 2010); sin embargo, en la última década se han reportado una gran cantidad de aislamientos a partir de muestras de suelo y agua, lo que influye en una mayor dispersión del patógeno (Liu et al., 2018).

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *S. enterica*; y ésta última, en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diazarizonae*, *houtenae* e *indica* (**Figura 1**) (Ryan et al., 2017), que se diferencian en función de la composición bioquímica de carbohidratos, flagelos y lipopolisacáridos (LPS), dando lugar a más de 2,500 serovares o serotipos, algunos de ellos con hospederos específicos (**Cuadro 1**) (Jajere, 2019).

Los serotipos de *Salmonella* pueden designarse mediante una fórmula antigénica basada en antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) (Martins et al., 2014), siendo Choleraeuis, Enteritidis, Typhi, Paratyphi A, B y C los serotipos más prevalentes en humanos (USDA, 2018). Los serotipos reportados como principales causantes de morbilidad en humanos son Typhimurium y Enteritidis (Litvak et al., 2019).

La clasificación de *Salmonella* ha sido compleja; sin embargo, además de la clasificación taxonómica, los serotipos de *Salmonella* puede agruparse en

Salmonella Tifoidea (ST) y *Salmonella* No tifoidea (SNT), de acuerdo al síndrome clínico asociado (Martins et al., 2014). La ST provoca fiebre tifoidea; mientras que, la SNT se asocia con gastroenteritis y es causante de morbilidad y mortalidad considerables en humanos ya que también puede provocar enfermedades invasivas graves (Smith et al., 2016; Ke et al., 2020).

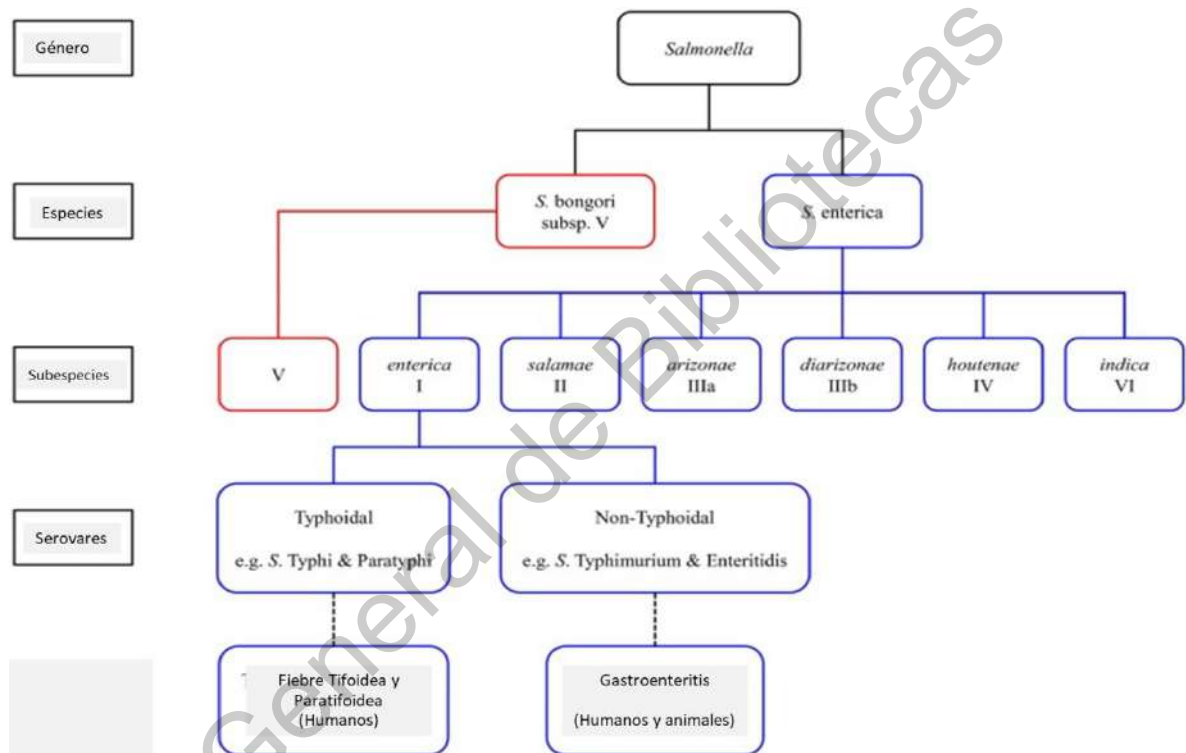


Figura 1. Clasificación taxonómica de especies y subespecies de *Salmonella*

Fuente: (Martins et al., 2014)

La infección por *S. enterica* en humanos, generalmente puede adquirirse y transmitirse mediante el consumo y manipulación de alimentos contaminados; también puede adquirirse por contacto directo con animales portadores del patógeno (Silva et al., 2017).

Cuadro 1. Número presente de serovares en cada especie y subespecie de *Salmonella*, y hospedero

Especie	No. serovares	Principales Serovares	Hospedero
<i>S. bongori</i>	22		
<i>S. enterica</i>	2557		
Subespecie			
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1531	Abortusovis Choleraesuis Enteritidis Typhimurium Gallinarum Paratyphi A Paratyphi B Paratyphi C Typhi Typhiuis	Ovejas Humanos y animales Humanos y animales Humanos y animales Aves Humanos Humanos Humanos Humanos Cerdos
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73		Animales de sangre fría
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13		

Fuente: (Brenner et al., 2000; Cabral, 2010; Corcoran et al., 2014)

2.1.1 *S. enterica* en alimentos

El consumo de alimentos contaminados con *S. enterica* provoca gastroenteritis aguda (Kunwar et al., 2013). Este patógeno es el agente causal más común de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) (WHO, 2018). Las infecciones por *S. enterica* representan la mitad de las ETAs en humanos, siendo Enteritidis y Typhimurium los serotipos más reportados con 1239 y 922 casos (por cada 100 mil habitantes) respectivamente, en Estados Unidos (Adley & Ryan, 2016; Litvak et al., 2019; Banerji et al., 2020).

A pesar de que se han establecido programas estrictos de control para reducir la prevalencia de *S. enterica* en alimentos (USDA, 2016), cada año surgen numerosos brotes de Salmonelosis a nivel mundial (FDA, 2018; Jajere, 2019; Litvak et al., 2019). Actualmente se reconoce que estos nuevos brotes son generados por cepas resistentes al uso de anti-microbianos empleados en la sanitización de alimentos (Corcoran et al., 2014), desde los sistemas de producción primaria y procesamiento, hasta los puntos de venta (Deng et al., 2018; Chen et al., 2020;).

S. enterica se ha detectado en alimentos como huevo, frutas, verduras, leche o jugos no pasteurizados y está principalmente asociada a productos cárnicos crudos como la carne de pollo (Adley & Ryan, 2016; NIH, 2019).

2.2 Prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo

A nivel mundial se han reforzado los sistemas para el monitoreo y control de *S. enterica* a lo largo de la cadena de producción de carne de pollo. Su principal objetivo es evitar la presencia de agentes patógenos que puedan ser transmitidos o transportados a través de la carne (Huneau-Salaün et al., 2015). Sin embargo, a pesar del éxito de las medidas de control implementadas en la producción de alimentos y animales, una de las principales fuentes de infección para el ser humano sigue siendo la carne de pollo contaminada (Antunes et al., 2016).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios alrededor del mundo para determinar la presencia de *S. enterica* en carne de pollo; las prevalencias reportadas oscilan entre ~35% y 50% para el continente Asiático, ~35% en África y de ~13% a 39% para Sudamérica (Antunes et al., 2016; Deng et al., 2018).

Esta información ha destacado la importancia de realizar un monitoreo constante en distintos puntos de venta de carne de pollo. Por ejemplo, en Malasia, se han presentado prevalencias de hasta el 100% en muestras (canales de pollo y cortes de carne) provenientes de mercados húmedos y plantas de procesamiento a pequeña escala (Nidaullah et al., 2017). Por otra parte, en Trinidad y Tobago se han reportado prevalencias del 20.5% para carne de pollo de plantas de procesamiento y 8.3% en supermercados (Khan et al., 2018).

En México la situación no es muy distinta, Regalado y colaboradores reportan un incremento en la prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo del 20.8% al 42% en tres años de monitoreo en puntos de venta (Regalado-Pineda et al., 2020). Estas investigaciones sugieren que *Salmonella* se ha establecido en entornos de producción y procesamiento de aves de corral (Nidaullah et al., 2017); por esta razón resulta importante estudiar el potencial de virulencia de las cepas recuperadas de carne de pollo.

2.3 Contribución de *S. enterica* en carne de pollo a casos de Salmonelosis en humanos

Como se ha descrito, los casos de gastroenteritis por *S. enterica* siguen siendo causa común de ETAS a nivel mundial, según datos de Estados Unidos de América, países europeos y países en desarrollo (Wang et al., 2020). Por ejemplo, en África se ha reportado entre 2, 000 y 7, 500 casos de infección por *S. enterica* por cada 100, 000 adultos (Majowicz et al., 2010); mientras que, en Australia se notificaron 127,195 casos de infección por *Salmonella* entre los años 2000 y 2013; sin embargo, se considera que dichos casos fueron subestimados y, que por cada

caso de infección por *S. enterica* reportado, hay siete casos de salmonelosis que no han sido reportados (Gut et al., 2018).

Además, en Europa la salmonelosis es la segunda zoonosis más común, con un reporte de 20.4 casos por cada 100, 000 habitantes; en Estados Unidos se estiman más de 1 millón de casos anuales de salmonelosis transmitidas por alimentos que se asociaron con un mayor número de hospitalizaciones y muertes; por otra parte, en México se han reportado 92,013 casos de salmonelosis causados por SNT en 2017 (Antunes et al., 2016; Godínez-Oviedo et al., 2020).

En el monitoreo de *S. enterica* en carne de pollo, los serotipos más prevalentes son Enteritidis, Derby, Typhimurium, Agona, Rissen, Hadar y Anatum; en carne molida de pollo los serotipos más reportados son Anatum, Newport, Typhimurium y Derby, lo que puede implicar contaminación de los productos cárnicos a lo largo de la cadena de producción o procesamiento primario (Villalpando-Guzmán et al., 2017; Deng et al., 2018;)

A pesar de los sistemas de vigilancia epidemiológica y sistemas de monitoreo de este patógeno, la información sobre morbilidad causada por *S. enterica* recuperada de carne de pollo es limitada (Chen Y. et al., 2020). En América Latina, se ha reportado que el 24% de los brotes de salmonelosis se han asociado a productos cárnicos (Ford et al., 2018); sin embargo, se desconoce la atribución de casos de salmonelosis a un alimento específico, como la carne de pollo. Conjuntamente, algunas investigaciones sugieren que no existe correlación significativa entre las prevalencias de *Salmonella* en pollo crudo y las incidencias de salmonelosis en humanos (Cox et al., 2011; Regalado-Pineda et al., 2020).

La investigación sobre serotipos de *S. enterica* y los vehículos alimentarios asociados a brotes en humanos, como la carne de pollo, puede ayudar al desarrollo de estrategias de prevención para reducir la incidencia de estos serotipos y su afección en salud pública (Ford et al., 2018). Por esta razón, es necesario evaluar el potencial de virulencia de las cepas recuperadas de carne de

pollo, con la finalidad de elucidar su contribución en casos de salmonelosis en humanos.

2.4 Mecanismo de infección de *S. enterica*

El ingreso de *S. enterica* en el hospedero es a través de la vía fecal-oral, principalmente a través de alimentos contaminados; al inicio de la infección, esta bacteria se enfrenta a diversos cambios como: pH ácido, aumento de temperatura, baja tensión de oxígeno y alta osmolaridad; de tal forma que utiliza estrategias para sobrevivir, colonizar y alcanzar su dosis infectiva ($\sim 10^5 - 10^6$ de células) e invadir (Ochoa & Rodríguez, 2005; Gut et al., 2018).

S. enterica activa su respuesta ácido tolerante (ATR, por sus siglas en inglés) (Dos Santos et al., 2019) y se internaliza en el intestino al invadir la mucosa, donde compete con la microbiota intestinal por nutrientes y sitios de adhesión a la mucosa intestinal (Kang et al., 2018; Tanner & Kingsley, 2018; Litvak et al., 2019). Más tarde, este patógeno invade el epitelio intestinal y se adhiere a los enterocitos a través de fimbrias (Elbi et al., 2017).

En el desarrollo de la infección, *S. enterica* manipula los mecanismos de defensa del hospedero al exocitarse en los espacios intersticiales de la lámina del intestino (Gut et al., 2018), y a través de la inyección de proteínas efectoras provoca la internalización de la bacteria en las células del epitelio intestinal, para establecer un nicho celular en el fagosoma, formando una estructura denominada 'Vacuola que Contiene a *Salmonella*' (SCV, por sus siglas en inglés) (Haraga et al., 2008; Knuff & Finlay, 2017;). De esta manera, *S. enterica* resiste el ataque de macrófagos, péptidos antimicrobianos, sales biliares y complemento sérico con la finalidad de sobrevivir y proliferar para llegar a órganos linfoides y lograr su distribución sistémica en bazo e hígado (Ellis et al., 2019).

Sin embargo, recientemente se ha evidenciado que solo una pequeña proporción de las células de *S. enterica* invaden el epitelio intestinal y que la mayor parte de la población bacteriana permanece en el lumen del intestino, donde se genera una ventaja selectiva del patógeno sobre la microbiota intestinal debido a la respuesta inflamatoria que induce en el hospedero (Hume et al., 2017).

2.5 Regulación de la inflamación.

En la última década, se ha evidenciado que *S. enterica* promueve la inflamación intestinal mediante la producción de fuentes de carbono y aceptores terminales de electrones, fomentando su proliferación (Palmer & Slauch, 2017; Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2018). Además, estudios genómicos comparativos evidenciaron la presencia de ~470 genes de metabolismo central de *S. enterica* que están asociados a la utilización de nutrientes derivados de la inflamación (Thiennimitr et al., 2011).

Durante la infección, la adhesión de *S. enterica* en las células epiteliales del hospedero (a través de flagelina, por ejemplo) y su internalización en la lámina intestinal, provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias que desencadenan una respuesta inflamatoria local, misma que le confiere ventajas a *S. enterica* sobre la microbiota intestinal al provocar una diarrea aguda (Palmer & Slauch, 2017). Esta diarrea osmótica elimina la mayoría de los nutrientes presentes en el lumen y a miembros de la microbiota intestinal, además de causar ulceración y destrucción de células de la mucosa (Gut et al., 2018; Tanner & Kingsley, 2018).

Durante el proceso inflamatorio, el hospedero oxida tiosulfato intestinal en tetrionato; además, secreta fosfatidil-etanolamina, el fosfolípido más abundante en la membrana de los enterocitos (Tanner & Kingsley, 2018). Las altas concentraciones de etanolamina y tetrionato permiten el desarrollo selectivo de *S. enterica* en la mucosa intestinal (Stoffels et al., 2012; Anderson et al., 2015).

Recientemente se demostró que el proceso inflamatorio también estimula la replicación y liberación de bacteriófagos contenidos en el cromosoma de *S. enterica*; al activarse la fase lítica, se incrementa a nivel intestinal, la transferencia y re-arreglo de genes que codifican para factores de virulencia (Nuccio & Bäumler, 2014). Estos resultados indican que en su evolución *S. enterica* ha adquirido diversas estrategias para regular los procesos inmunológicos en el hospedero, eliminar a la competencia para sobrevivir y promover su desarrollo.

2.6 Factores de virulencia de *S. enterica*

El sistema inmunitario del hospedero puede prevenir la invasión microbiana y eliminar patógenos; sin embargo, *S. enterica* ha desarrollado mecanismos para resistir barreras físicas del hospedero e inhibir la activación posterior de la respuesta inmunitaria a través de factores de virulencia (Wang et al., 2020).

El conjunto de mecanismos deriva en un complejo sistema de virulencia presente en *S. enterica*, ya que numerosos genes participan en su patogenicidad; algunos están implicados en la invasión del patógeno en el sistema de defensa del hospedero, otros juegan un papel importante en la supervivencia y replicación de *S. enterica* dentro del huésped; otros genes están involucrados en la producción de moléculas que producen los síntomas de la enfermedad. Los diferentes genes asociados a la virulencia pueden estar contenidos en cromosomas, Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) y en plásmidos de virulencia (**Cuadro 2**) (Möst, 2014; Singh et al., 2018).

En el cromosoma, los genes de virulencia se encuentran en las SPI y producen moléculas efectoras que favorecen la invasión, replicación y supervivencia de *S. enterica* en el hospedero. Por ejemplo, los genes que codifican para flagelos, aumentan la invasividad del patógeno mientras que las especies reactivas de oxígeno (EROs), son inactivadas por la superóxido dismutasa producido por esta bacteria (Gut et al., 2018; Singh et al., 2018).

Cuadro 2. Principales genes de virulencia identificados en *S. enterica*

Genes de virulencia	Localización	Función
SipA, SipC	SPI-1	Reestructuración del citoesqueleto Quimiotaxis
SipB	SPI-1	Translocación de proteínas efectoras Evasión de apoptosis en macrófagos
SptP	SPI-1	Supresión de inmunidad innata
Genes <i>irr</i>	SPI-2	Producción de tetrionato reductasa
SseK	SPI-2	Efectores del T3SS
SpiC	SPI-2	Translocación de proteínas efectoras en el citosol de los macrófagos Sobrevivencia en SCV Inhibición de señalización del interferón gamma que activa a macrófagos
SseB, SseC, SseD	SPI-2	Formación de estructuras macromoleculares de translocación
SseF, SseG	SPI-2	Migración perinuclear de SCV Agregación de microtúbulos Formación de filamentos
MisL	SPI-3	Persistencia a largo plazo
MgtCB	SPI-3	Sobrevivencia en macrófagos
MarT	SPI-3	Activación de expresión de MisL
SiiE	SPI-4	Adhesión al epitelio

SopB	SPI-5	Prevención de apoptosis en células epiteliales
SigE	SPI-5	Chaperona
pipD	SPI-5	Codifica homólogo de cisteína proteasa, esencial para infección sistémica
SpvR	pSLT	Regulación de genes del operón <i>spv</i>
SpvB	pSLT	Prevención de polimerización de actina
SpvC	pSLT	Inhibición de MAPK y señalización inmune
Fimbria Tipo 1	Cromosoma	Adhesión al epitelio
SifA	Cromosoma	Formación de filamentos Mantenimiento en SCV
SseJ	Cromosoma	Formación de filamentos
SopE, SopE2	Cromosoma	Inducción de ondulación de membrana en cultivo celular
iroA	Miembro de iroBCDEN	Interrumpe la homeostasis en macrófagos del hospedero
iroB	Miembro de iroBCDEN	Síntesis y transporte de enterobactina, sideróforo esencial para la absorción de hierro en el hospedero

Fuente: (Dos Santos et al., 2019; Mthembu et al., 2019; Zhang et al., 2019)

Los sistemas de adquisición de iones en *S. enterica* son críticos para su supervivencia y patogénesis en el intestino: además, otros genes de virulencia contenidos en plásmidos son responsables de la diseminación sistémica de la infección en ganglios linfáticos mesentéricos (bazo e hígado) (Gut et al., 2018). En conjunto, estos genes son regulados por factores de transcripción en respuesta a

señales ambientales, y condiciones de estrés a las que se enfrenta *S. enterica* ya sea en medios naturales o en el hospedero (Spector & Kenyon, 2012).

2.6.1 Capacidad de sobrevivencia de *S. enterica*

La capacidad de supervivencia de *S. enterica* en un nicho determinado, se ha evidenciado en distintas condiciones y depende de ciertos factores; por ejemplo, la capacidad de formación de biopelículas le permite a *S. enterica* sobrevivir a largo plazo en ambientes externos al hospedero (Waldner et al., 2012). También se ha reportado que bajo condiciones de estrés generado por la exposición a bajas dosis de fármacos o antimicrobianos, se permite la sobrevivencia y se incrementa la virulencia de *S. enterica* (Barreto et al., 2016).

Por otra parte, se ha descrito la capacidad de sobrevivencia de *S. enterica* en el hospedero, dependiente de distintos mecanismos; durante la infección esta bacteria tiene la facultad de adherirse al intestino, mediante adhesinas como fimbrias, fibrillas, flagelos, lipopolisacárido (LPS) y cápsula; y de esta manera continuar con el proceso infeccioso (Ochoa & Rodríguez, 2005; Waldner et al., 2012).

Posteriormente, una vez que ha pasado un periodo de adaptación (3 -4 horas), *S. enterica* tiene la capacidad de replicarse dentro de la SCV, situación que favorece la expresión de genes que aumentan la supervivencia intracelular al establecer un ambiente microsomal (Ochoa & Rodríguez, 2005; Steele-Mortimer, 2008). La modificación de la SCV y modulación de procesos intracelulares, están a cargo de proteínas efectoras de *S. enterica* que interactúan con la maquinaria de la célula huésped; de esta manera, el patógeno asegura su sobrevivencia y replicación (Forest et al., 2010). Estas cualidades determinan si *S. enterica* puede diseminarse desde el sitio de colonización (intestino) para establecer una infección sistémica (Wang et al., 2020).

2.6.2 Mecanismos de invasión de *S. enterica*

El inicio de la invasión de *S. enterica* es a través del tejido linfoide, incluyendo las placas de Peyer (PP); en mamíferos se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y células M (Ochoa & Rodríguez, 2005). Derivado del contacto, la bacteria induce la entrada de metabolitos microbianos al citosol de las células, mediante los sistemas de secreción del patógeno como punto clave en la patogénesis de *S. enterica*. Como consecuencia, se desencadenan respuestas pro inflamatorias en el hospedero (Winter et al., 2014; Mambu et al., 2017).

La principal determinante de invasividad de *S. enterica* es el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), una maquinaria molecular que inyecta proteínas efectoras de virulencia en las células del hospedero (Steele-Mortimer, 2008; Hume et al., 2017) y que es codificada en las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI) (Howe et al., 2017).

2.7 Islas de patogenicidad de *Salmonella*

Las Islas de Patogenicidad (SPI) son grandes paquetes de genes que pueden adquirirse por transferencia genética horizontal; por ejemplo, los genes de virulencia involucrados en la fase intestinal se encuentran en las SPI-1 y SPI-2 y codifican un sistema de secreción tipo III asociado a la membrana (T3SS), que a su vez secretan un conjunto de proteínas efectoras que alteran el funcionamiento de células eucariotas para facilitar la patogenicidad de *Salmonella* (Siriken, 2013; Mthembu et al., 2019). De esta forma, una vez que *S. enterica* se ha adherido a las células del hospedero en el lado apical de la células M o enterocitos, utiliza sus SPI y sistemas de secreción tipo III (T3SS) para fagocitarse en los macrófagos (Gut et al., 2018).

2.7.1 Isla de Patogenicidad I (SPI-1)

Como se ha mencionado, *S. enterica* presenta numerosos genes involucrados en la invasión de células epiteliales, dichos genes se encuentran localizados en el centisoma 63 y forman la Isla de Patogenicidad I (SPI-1); este segmento de 35 – 40 kb contiene 31 genes divididos en tres categorías: genes que codifican el Sistema de Secreción Tipo III (T3SS), genes que codifican proteínas involucradas en la translocación de las moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula del hospedero y genes que codifican las proteínas efectoras y sus chaperonas (Ochoa & Rodríguez, 2005; Forest et al., 2010).

Sin embargo, las proteínas codificadas por la SPI-1 pueden elicitar la respuesta inmunitaria del hospedero durante la infección ya que *S. enterica* induce el reclutamiento de neutrófilos, reducción de macrófagos y alteración de la microbiota intestinal través de la SPI-1 (Lou et al., 2019).

2.7.2 Isla de Patogenicidad II (SPI-2)

La SPI-2 tiene un tamaño de 40 kb, se localiza en el centisoma 31 y tiene un porcentaje de C-G 44.6%; además, consta de 32 genes que se requieren para traslocar al menos 30 proteínas efectoras de las bacterias residentes en la Vacuola que Contiene a *Salmonella* (SCV) a las células del hospedero, de tal manera que se favorece la replicación de *S. enterica* en células del hospedero, incluidos los macrófagos (Ochoa & Rodríguez, 2005; Figueira et al., 2013; Jennings et al., 2017).

La virulencia de *S. enterica*, depende en parte de esta SPI-2, su activación ocurre cuando la bacteria se encuentra en la SCV y es esencial para la supervivencia y replicación de *S. enterica* en las células del hospedero (Forest et al., 2010; Figueira & Holden, 2012).

2.7.3 Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)

S. enterica utiliza dos T3SS (T3SS1 y T3SS2) que son esenciales para la invasión y diseminación de la bacteria. El T3SS1, denominado complejo aguja, se ensambla a partir de las proteínas codificadas por la SPI-1; por otra parte, el T3SS2, es codificado por la SPI-2 (Lou et al., 2019; Wang et al., 2020).

El T3SS1 se encarga de translocar proteínas efectoras en el citosol de la célula del hospedero; de esta manera, se promueven cambios en el citoesqueleto y facilita el ingreso de la bacteria por macropinocitosis (Velasco-Carrillo et al., 2019). Por otra parte, el T3SS2 se encarga de la translocación de proteínas efectoras al sistema de endomembranas y al plasma del hospedero, acciones que permiten la replicación intracelular de *S. enterica* en la SCV (Figueira & Holden, 2012).

En conjunto, esta maquinaria (T3SS1 y T3SS2), presenta requerimientos particulares para su función; por ejemplo, se requieren chaperonas específicas para la secreción de algunas proteínas efectoras, además de una señal inductora para la activación completa del sistema. Dicha señal generalmente es el contacto con la célula del hospedero (Ochoa & Rodríguez, 2005).

Se puede suponer que la combinación específica de los factores de virulencia determina el potencial de virulencia de las cepas de *S. enterica*, por lo que es necesario continuar con estudios que permitan dilucidar la complejidad en la patogenicidad de esta bacteria.

2.8 Interacción patógeno–hospedero (Patogenicidad)

El resultado de la infección por *S. enterica* depende del serotipo involucrado y el estado inmunológico del huésped infectado. La respuesta inmunitaria temprana por parte del hospedero ante la infección por *S. enterica*, en las PP y ganglios linfáticos mesentéricos implican reclutamientos de neutrófilos y monocitos

inflamatorios, con la finalidad de retrasar la llegada del patógeno a tejidos linfáticos (Martins et al., 2014; Pham & McSorley, 2015).

Las células epiteliales y células fagocíticas, así como células dendríticas (DC), neutrófilos y macrófagos identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) endógenas en las bacterias. Este reconocimiento se realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que incluye receptores tipo Toll (TLR) que desencadenan una respuesta inmunitaria al activar células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos (Martins et al., 2014). Es así que, después de la ingesta vía oral, *S. enterica* se adhiere a células intestinales y desencadena una vía de señalización al involucrarse en la SCV, esta vía desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias en el intestino (Singh et al., 2018).

Además, *S. enterica* posee la capacidad de invadir tanto células fagocíticas como no fagocíticas mononucleares presentes en folículos linfoides, hígado y bazo, incluidos linfocitos B, linfocitos T, neutrófilos, monocitos y células dendríticas; de esta manera al invadir el epitelio intestinal, las bacterias son transportadas por DC, a través del torrente sanguíneo a varios órganos como el hígado y bazo (Pham & McSorley, 2015; Huang et al., 2020). Por ejemplo, *S. Typhimurium* no requiere colonización intestinal o invasión de células epiteliales intestinales; la bacteria es llevada directamente del lumen intestinal a circulación, bazo e hígado a través de fagocitos que expresan CD18 (Ochoa & Rodríguez, 2005).

Por otra parte, el sistema inmunitario del hospedero puede dividirse en dos partes principales, los componentes innatos o inespecíficos y los adaptativos o específicos. El sistema inmunitario innato es el primer desafío del hospedero que se presenta a los patógenos; la segunda parte se refiere al sistema inmunitario adaptativo proporciona una protección adicional y memoria inmunológica. La interacción entre ambos sistemas, incluidas sus moléculas como citoquinas y anticuerpos, conforman la totalidad de la inmunidad del hospedero ante una infección (Martins et al., 2014; Huang et al., 2020).

Al estudiar *S. enterica* recuperada de matrices alimentarias, es necesario caracterizar la interacción patógeno – hospedero, tomando en cuenta las variables de acuerdo al modelo de estudio. Para este cometido, pueden emplearse modelos biológicos que permitan tal evaluación.

2.9 Uso de modelos biológicos para el estudio de la interacción patógeno-hospedero

Para entender la contribución de los repertorios genéticos en la virulencia de los aislamientos de *S. enterica*, se pueden utilizar organismos modelo validados (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Dictyostelium discoideum* y *Drosophila melanogaster*) que permitan elucidar las bases moleculares de la interacción *Salmonella*-hospedador (Verma & Srikanth, 2015; Kang et al., 2018).

Entre los diferentes organismos modelo, *D. melanogaster* ofrece múltiples ventajas en desafíos de infección: por ejemplo, tiempos generacionales cortos, fácil reproducción en el laboratorio y manejo, así como bajo costo de mantenimiento (Steinert et al., 2003; Igboin et al., 2012). Además, existe disponibilidad de repositorio de mutantes genéticas (> 60,000 variantes) y numerosas bases genómicas (BDSC, 2017; DroID, 2018; FlyBase, 2019).

Otra ventaja importante sobre los otros organismos modelo invertebrados, es que *D. melanogaster* posee un sistema inmunológico basal conservado, que es homólogo al que presentan los mamíferos (Dionne & Schneider, 2008; Apidianakis & Rahme, 2009; Khalil et al., 2015). Por estas razones, *D. melanogaster* es un sistema modelo viable para estudiar el potencial de virulencia de *S. enterica* recuperada de carne de pollo.

2.10 *Drosophila melanogaster* como sistema modelo

Para comprender las interacciones patógeno-hospedero, durante décadas se han empleado modelos de infección no mamíferos que proveen información para comprender mecanismos moleculares (Lee et al., 2018). *D. melanogaster* es considerado un organismo de laboratorio ampliamente utilizado como sistema modelo, mismo que está altamente caracterizado y juega un papel cada vez más importante en la modelación de enfermedades humanas (Markow, 2015).

A pesar de que *D. melanogaster* no posee un sistema inmunitario adaptativo, el componente de sistema inmunitario innato es muy similar a la que se presenta en mamíferos (Castonguay-Vanier et al., 2010). Se estima que aproximadamente el 65% de los genes de enfermedades humanas presentan homología con *D. melanogaster*, característica que favorece el uso de este organismo como sistema modelo para estudiar mecanismos de infección y progresión de la enfermedad; además, *D. melanogaster* permite el estudio de interacciones huésped – patógeno, y la posibilidad de identificar los factores implicados en la defensa del hospedero y la virulencia del patógeno (Reid, 2017; Younes et al., 2020).

Comprender las interacciones huésped-patógeno, a través del uso de *D. melanogaster* como modelo biológico, es una alternativa viable para combatir el constante incremento de cepas patógenas, así como la transmisión de patógenos en alimentos, considerando las homologías que este organismo presenta en comparación con el humano, respecto a la respuesta inmunitaria innata (**Figura 2**) (Nehme & Ewbank, et al., 2007; Verma & Srikanth, 2015).

2.10.1 Estudios de potencial de virulencia en *D. melanogaster*

La ausencia de respuesta de inmunidad adaptativa en *D. melanogaster* permite estudiar las interacciones asociadas al sistema inmunológico innato, así como las bases moleculares de la infección sistémica (Apidianakis & Rahme, 2009; Igboin et

al., 2012) e interacciones patógeno-hospedador (Gharieb et al., 2015; Pava-Ripoll et al., 2015).

Diversos estudios han demostrado el valor de realizar estudios de virulencia en el sistema modelo de *D. melanogaster*. Estos trabajos han permitido conocer la cinética de infección, tasas de letalidad y mortalidad, capacidad de transmisión horizontal y vertical entre organismos infectados, así como el efecto de la infección sobre la respuesta de inmunidad innata (**Cuadro 3**).

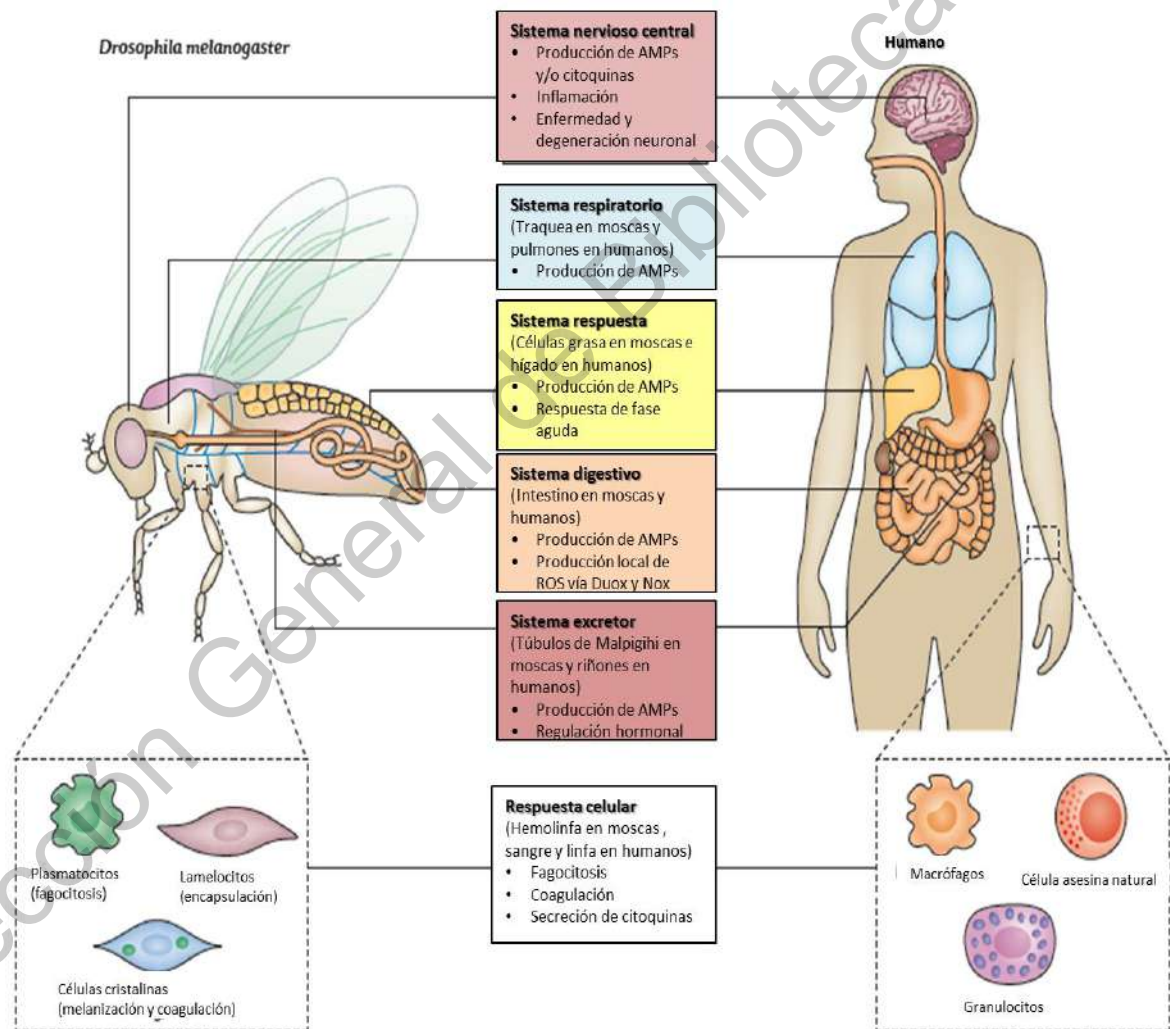


Figura 2. Homologías de *Drosophila melanogaster* con el humano

Fuente: (Verma & Srikanth, 2015)

Cuadro 3. Estudios de infección con enterobacterias en el sistema modelo *D. melanogaster*

Microorganismo	Estadío	Mecanismo de infección			Contribución
		Micro- inyección	Punción	Alimento	
<i>Listeria innocua</i> <i>Salmonella</i> <i>Saint Paul</i> <i>E. coli</i>	Adulto	NA	NA	Inoculado con 1mL (1x10 ⁸ UFC/ml)	Se comprueba la capacidad como vector.
<i>S. enterica</i> <i>Cronobacter sakazakii</i> <i>E. coli O157:H7</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Adultos	NA	NA	Inoculado con 1 ml (1x10 ⁸ UFC/ml)	Transmisión vertical en función a concentración del patógeno.
<i>E. coli, S. aureus</i> inactivadas. Desafío con <i>E. fecalis</i> y <i>P. aeruginosa</i>	Larvas L1, L2, L3, pupa y, adultos	NA	Aguja sumergida en solución con carga bacteriana	Alimentación con <i>E. coli</i> inactiva. Posterior desafío oral	Activación de respuesta inmune del hospedero ante el desafío con bacterias inactivas
<i>Providencia rettgeri</i> <i>E. coli</i>	No indicado	Superficie ventro-lateral 1x10 ⁸⁻⁹ UFC/ml	Superficie ventro-lateral, cutícula (abdomen)	NA	La mortalidad es proporcional a dosis infectante.

Microorganismo	Estadío	Mecanismo de infección			Contribución
		Micro- inyección	Punción	Alimento	
<i>Providencia rettgeri</i>	Adulto	NA	En tórax con pin de disección (0.15 mm) que fue sumergido en cultivo bacteriano (1×10^2)	NA	La tasa de letalidad, está relacionada con una dosis mínima infectante.
<i>P. aeruginosa</i>	Adulto	Hemolinfa	Epitelio torácico	Alimento ($10^4 - 10^5$ UFC/ml)	Cinética bacteriana de acuerdo a dosis infectiva.

Fuente: (Apidianakis & Rahme, 2009; Howick & Lazzaro, 2014; Khalil et al., 2015; Pava-Ripoll et al., 2015; Khamesipour et al., 2018; Wen et al., 2019).

2.10.2 Infección con *S. enterica* en *D. melanogaster*

Diversos estudios demuestran la utilización de *D. melanogaster* como modelo biológico para estudiar la infección con *S. enterica* (Apidianakis & Rahme, 2009; Howick & Lazzaro, 2014; Elbi et al., 2017; Khamesipour et al., 2018). Estos estudios han evidenciado que al igual que en mamíferos, una vez que *S. enterica*,

ha cruzado el epitelio intestinal de *D. melanogaster*, se disemina en el hospedero, para alcanzar su crecimiento exponencial (Khalil et al., 2015).

En *D. melanogaster* se consideran dos fases distintas de infección: la primer fase, conocida como fase aguda que abarca desde el primer hasta el tercer día de infección y se caracteriza por una alta concentración de patógenos, elevada mortalidad y reducción de la fecundidad; y la fase crónica, considerada a partir del día cuatro al cinco, con carga de patógenos substancial que no antecede necesariamente a mortalidad (Gharieb et al., 2015).

Al igual que las fases de infección, existen fases en la respuesta inmunitaria que se elicitada en *D. melanogaster*; la primer fase puede consistir en una rápida activación con respuesta de segundos a minutos y, en segundo lugar, se provoca fagocitosis y melanización (Chambers et al., 2012). De tal forma, que ante una infección, la mosca puede combatir a patógenos a través del uso de barreras físicas como tejido epitelial, fisiológicas como enzimas de digestión y pH; a través de proteínas antimicrobianas de la respuesta inmunitaria innata como la secreción de Péptidos Antimicrobianos, (AMP por sus siglas en inglés), que son regulados por proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP) (Howick & Lazzaro, 2014; Wen et al., 2019).

El intestino de *D. melanogaster* está compuesto por un epitelio tubular del tracto digestivo que puede dividirse en intestino anterior, intestino medio e intestino posterior. El intestino medio es el sitio principal de digestión y absorción de nutrientes y de principal interacción con patógenos (Mondotte et al., 2018). En este sitio, los mecanismos que regulan la defensa contra *S. enterica* son: barreras físicas, compuesta por quitina y glicoproteínas (matriz pleriotrópica e integridad epitelial), que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), evitan daño físico y regulan el paso de partículas entre el lumen y los enterocitos; y la secreción de AMPs mediante la ruta IMD (inmunodeficiencia) (Hori et al., 2018).

2.10.3 Respuesta inmunitaria de *D. melanogaster* ante infección por *S. enterica* - Péptidos Antimicrobianos (AMPs)

Estudios recientes indican que *D. melanogaster* se vale de algunas herramientas para combatir al patógeno: la primera es mediante la inducción de la respuesta humoral (secreción de péptidos antimicrobianos por el cuerpo graso “fat body”); seguido de la respuesta de melanización que expone al patógeno a oxígeno reactivo y melanina y finalmente la respuesta inmunitaria celular (fagocitosis) (Brandt et al., 2004; Hori et al., 2018).

Durante los procesos inflamatorios inducidos por *S. enterica*, en mamíferos, las citoquinas como TNF e interferón revelan información sobre la infección y patología; de manera similar, una proteína tipo TNF codificada por el gen *eiger* en *D. melanogaster*, es la encargada de dicha acción, y su sobreexpresión puede inducir muerte celular (Brandt et al., 2004).

Por otra parte, en el lumen intestinal de *D. melanogaster* dos mecanismos efectores complementarios son los que controlan la infección por bacterias Gram-negativas: generación de EROs por la enzima Duox NADPH oxidasa y la producción de AMPs como *Diptericina*, *Drosomicina* y *Attacina* mediante el homólogo del factor de transcripción NF- κ B o Cactus (Buchon et al., 2009; Kenmoku et al., 2017).

Los AMPs son proteínas que tienen patrones moleculares asociados a los receptores tipo Toll. Son moléculas de la inmunidad innata, sintetizadas y liberadas por las células grasas, homólogas al hígado en humanos, que generan una respuesta inflamatoria y son reguladas por PGRP; su principal función es la defensa antimicrobiana (Buchon et al., 2009; Pava-Ripoll et al., 2015; Khan et al., 2018; Salazar et al., 2018).

La expresión de AMPs en *D. melanogaster* comienza aproximadamente 4 horas después de la infección y continúa en aumento durante las primeras 24 horas (Khalil et al., 2015); además, es directamente proporcional a la carga bacteriana e

incluso disminuye si se trata de altas concentraciones bacterianas (Pava-Ripoll et al., 2012). A través de la activación de las rutas Toll y IMD (Nehme & Liégeois, et al., 2007; Dionne & Schneider, 2008) se inducen y sintetizan los AMPs; la ruta Toll es activada por bacterias gram-positivas y la ruta IMD, por bacterias gram-negativas, siendo diptericina (*Dpt*) y drosomina (*Drs*), los AMPs expresados respectivamente (Pava-Ripoll et al., 2015).

Dirección General de Bibliotecas UAG

3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, *S. enterica* es un patógeno que genera más de 94 millones de gastroenteritis al año. Este patógeno de importancia global en salud pública es altamente prevalente en productos cárnicos; en general, países de Norte América y Europa reportan prevalencias entre el 20 y 30%. Estudios de nuestro laboratorio han revelado que en México la prevalencia de este patógeno oscila entre 20 y 40%. También se ha reportado que los productos cárnicos son los alimentos más prevalentes con *S. enterica*, principalmente la carne de pollo. En los últimos años, se han realizado estudios para elucidar el potencial de virulencia de las cepas recuperadas de matrices cárnicas. Sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes para evidenciar la contribución de estas cepas en los casos de infección *in vivo*.

En el presente proyecto se estableció un sistema biológico para estudiar la contribución de los repertorios genéticos de *S. enterica* en el potencial de virulencia *in vivo*. Para este fin, se realizaron ensayos de infección y transmisión en *Drosophila melanogaster*. Estos estudios permitirán identificar determinantes genéticas que facilitan la colonización y dispersión de *S. enterica*, y generar un marco de referencia para desarrollar estrategias más efectivas de prevención y control de este patógeno.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Identificar el potencial de virulencia de aislamientos de *S. enterica* prevalentes en alimentos, a través de estudios en el modelo *Drosophila melanogaster*

4.2 Objetivos específicos

1. Establecer el modelo de infección oral con *S. enterica* en *Drosophila melanogaster*.
2. Identificar el potencial de virulencia (morbilidad, mortalidad y replicación) de aislamientos de *S. enterica* recuperada a partir de muestras alimentarias.
3. Identificar los mecanismos moleculares que favorecen la colonización e infección de *S. enterica* en *Drosophila melanogaster*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Establecimiento y mantenimiento del modelo biológico

El cultivo estándar de la mosca se realizó de acuerdo a Tzou et al (2002) y Díaz-Peña et al (2019). Se utilizaron las cepas silvestres) Oregon-R (ORR) y *yellow white* (*yw*) de *Drosophila melanogaster*, misma que fueron donadas por el Dr. Juan R. Riesgo Escovar del Laboratorio de Genética de transducción de señales, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Qro. Las cepas de los organismos se cultivaron y resguardaron de acuerdo con los procedimientos establecidos en el laboratorio en mención. Este procedimiento consistió en colocar las moscas en frascos de cultivo, con alimento estéril, tapados con algodón (estéril), mantenidos a una temperatura de 25 °C. La totalidad de organismos se mantuvo bajo régimen de luz y oscuridad de 12:12. Todos los procedimientos para la manipulación de los organismos fueron realizados bajo criterios de manejo humanitario. Para la manipulación de la mosca durante la experimentación, se acondicionó un área que simula las condiciones del laboratorio de origen; el almacenamiento de los adultos fue a 18 °C, y las moscas bajo experimentación permanecieron a 25 °C, la anestesia de las moscas para la manipulación se realizó mediante un descenso de temperatura colocando hielo estéril en cajas Petri (tiempo aproximado de 5 a 10 segundos) de acuerdo a la metodología de Howick & Lazzaro (2014).

5.1.1 Elaboración de alimento para mantenimiento de *D. melanogaster*

De acuerdo a la metodología previamente publicada por Díaz-Peña et al. (2019), el alimento inicial para las moscas en el laboratorio se elaboró a partir de 50 g de piloncillo, 50 g de levadura de panadería activa, 8 g de agar en 500 ml de agua destilada, el pesaje y manejo de los insumos se realizó bajo las consideraciones de Buenas Prácticas de Manufactura.

La mezcla se esterilizó en autoclave durante 20 min a 121 °C y se dejó enfriar a 55 °C, punto donde se agregaron 5 ml de ácido propiónico y 7 g de gretina previamente disuelta en 100 ml de agua. El alimento se dispensó en tubos (10 ml) y frascos (40 ml), que fueron tapados con torundas de algodón previamente esterilizado. Se dejó solidificar el alimento a temperatura ambiente, en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar. Una vez solidificado, el alimento se almacenó a 4 °C en un contenedor hermético (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

5.1.2 Ajuste en la formulación de alimento para infección oral

Se sabe que *D. melanogaster* en condiciones ambientales se alimenta de levaduras presentes en frutos demasiado maduros, con la finalidad de obtener los nutrientes necesarios para su supervivencia (Lebreton et al., 2014). Por esta razón en las cepas cultivadas en laboratorio se busca realizar formulaciones de alimentos ricas en levaduras, con la finalidad de que este sea aceptado por las moscas. En este sentido, se realizó una variante de alimento (formulación de Lewis), rica en harina de maíz, dextrosa y sacarosa de acuerdo a la metodología de CSHP (2014), con algunas modificaciones, como la omisión del ácido propiónico con la finalidad de evitar ruido en el desafío oral con *S. enterica*.

Por otra parte, se ha demostrado que el papel de la levadura en la alimentación de *D. melanogaster* puede afectar el comportamiento de este organismo al interactuar con el sistema inmunitario de la mosca (Hoang et al., 2015). Por eso, realizó una segunda formulación de alimento sin levadura de acuerdo a la metodología de Kutzer et al. (2019).

5.1.3 Mantenimiento de cepas: Prueba de ovoposición

Para las cruces de *D. melanogaster*, de las estirpes Oregon – R, se seleccionaron grupos de organismos hembras y machos vírgenes en proporción 3:1

respectivamente. Estas proporciones se utilizaron para cada estirpe. Los organismos fueron colocados en agar para ovoposición, elaborados a base de jugo de uva y jarabe de maíz, de acuerdo a la formulación establecida en (BDSC, 2017). La biogénesis se realizó a las 24 h aproximadamente. Cada 24 h se realizó cambio de agar para nueva ovoposición y se realizaron conteos de embriones cada 24 h durante 5 días para determinar la tasa de fecundidad (Gou et al., 2016) **(Anexo II)**.

5.1.4 Método de anestesia

Para facilitar el manejo y selección de organismos que se utilizaron en los bioensayos, se aplicó un procedimiento de anestesia. El método que se estandarizó fue mediante enfriamiento con hielo de acuerdo a la metodología reportada por (Rayl & Wratten, 2016) con algunas modificaciones. Los organismos contenidos en los frascos de cultivo fueron direccionados a la parte baja del vial mediante acción mecánica. Posteriormente, se retiró la torunda de algodón que cubre el frasco de cultivo y este se volteó contra una placa estéril, soportada por otra que contiene hielo estéril; de esta manera puede llevarse a cabo una crioanestesia; proceso que permitió una recuperación del 90% de organismos después de 20 s aproximadamente. Este procedimiento se realizó en cada uno de los ensayos posteriores donde se requirió el manejo de organismos.

5.1.5 Indicador de consumo de inóculo

Para los ensayos de infección oral es necesario asegurar que los organismos de estudio hayan consumido el inóculo. Con esta finalidad, se decidió emplear un indicador del consumo de bacterias, para seleccionar los organismos de cada ensayo. El colorante azul de Coomassie o azul brillante No. 1, se utilizó en estos desafíos de acuerdo a la eficiencia reportada por (Shell et al., 2018). Según los

ensayos previos (**Anexo III**), se determinó utilizar la metodología de (Hori et al., 2018) con algunas modificaciones, para el uso del colorante como indicador de inóculo. Aquellos organismos que presentaron coloración azul en la superficie ventral abdominal, fueron clasificados como organismos con consumo de inóculo.

5.2 Validación microbiológica de estirpes en *D. melanogaster*

Previo a los desafíos de infección oral, se realizó una validación de las estirpes de *D. melanogaster* con la finalidad de evidenciar la ausencia de *Salmonella* en los organismos a emplear. Se utilizaron organismos de las estirpes yw y ORR bajo régimen de alimentación con y sin levadura [Lev (+) / Lev (-)]. Cada organismo se consideró una unidad experimental. El ensayo se realizó con 5 réplicas. Los organismos se lavaron con etanol al 70% y agua destilada estéril, posteriormente se maceraron y se realizaron microdiluciones seriadas. Se realizó siembra por goteo en placa de agar XLD + Novobiocina, de acuerdo al método de cultivo convencional (Lee K.-M. et al., 2015). *S. Typhimurium* se utilizó como control positivo y para todas las pruebas a excepción del control se detectó *Salmonella* presuntiva negativa en cultivo estándar; lo que valida que las estirpes de *D. melanogaster* son viables para el desafío oral.

5.3 Estandarización de protocolo para infección oral

5.3.1 Selección de cepas para infección oral

Para la estandarización del protocolo de infección oral se seleccionaron dos cepas de *S. enterica* crio-preservadas en glicerol (-20°C) (**Cuadro 4**), debido a que son los serotipos reportados como causantes de mayor morbilidad en humanos (Litvak et al., 2019).

Se realizó la activación de estas cepas en 15 ml de Caldo Luria – Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 12 h de acuerdo a la metodología establecida por (Sridhar & Steele-Mortimer, 2016).

Cuadro 4. Cepas activadas empleadas para infección oral

No.	ID LABORATORIO	CEPA
1	S2	S. Typhimurium ATCC 14028
2	S5	S. Enteritidis ATCC 13076
3	C-	Control negativo / Caldo LB

Por otra parte, para los ensayos de sobresalto y conducta se seleccionó la cepa de *S. Typhimurium* (ATCC 14028) como control positivo. Además se probaron dos cepas recuperadas de carne de pollo mediante el Sistema de Vigilancia permanente de *Salmonella* en carne de pollo, llevado a cabo por el laboratorio de Microbiología Molecular y se utilizó Caldo LB estéril como control negativo (**Cuadro 5**). La selección de estas cepas fue de acuerdo con la presencia o ausencia de SPI-1 y SPI-2, reportado en estudios previos por el equipo de trabajo. La verificación del control positivo se realizó mediante el software SPIfinder del Center Genomic Epidemiology.

Cuadro 5. Cepas seleccionadas para ensayo de actividad locomotora

ID	Serotipo	SPI-1	SPI-2	Fuente
C (+)	S. Typhimurium	X	X	(Roer et al., 2016)
S1	S. Newport	X	-	(Balbuena-Alonso, 2019)
S2	S. Newport	-	-	(Balbuena-Alonso, 2019)

5.3.2 Preparación de cultivo bacteriano

Pasado el periodo de incubación se realizaron lavados bacterianos empleando la metodología reportada por (Kutzer et al., 2019) con modificaciones. A partir del cultivo bacteriano en 15 ml de caldo LB, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 2880 rfc, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 5 ml de solución salina fisiológica (SSF) (0.9% NaCl); posteriormente, se resuspendieron las muestras y nuevamente se centrifugaron a 2880 rfc durante 10 min. Este procedimiento se realizó dos veces, obteniendo al final las bacterias resuspendidas en 5 ml de SSF. Una vez lavadas las bacterias se realizó una dilución décuple seriada en la totalidad de las muestras, adicionando 1 ml de la solución bacteriana en 9 ml de solución salina estéril (SSE) (0.85% NaCl) y se realizó el ajuste de concentraciones bacterianas a 1×10^8 UFC/ml en un espectrofotómetro (Varioskan Flash Photometric 550) a 600 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado.

A partir de las concentraciones bacterianas ajustadas para cada muestra, se realizaron diluciones quíntuples seriadas (-1 hasta -6); se incorporaron 2 ml de la solución bacteriana ajustada (1×10^8 UFC/ml) a 8 ml de SSE. Para cada dilución se realizó la medición de absorbancias a 600 nm por triplicado. Entre cada medición se realizaron dos enjuagues con etanol al 70% y uno más con agua destilada estéril. De igual manera, se realizaron conteos en placa a partir de las soluciones bacterianas para corroborar sus concentraciones.

5.3.3 Preparación de inóculo para infección oral

La preparación de inóculos para la infección oral se realizó con formulaciones distintas para los organismos con régimen de alimentación con levadura y sin levadura; se realizaron mezclas de acuerdo a la metodología reportada por (Stevanovic et al., 2015) con modificaciones, donde los componentes de la mezcla variaron de acuerdo a los tratamientos, con extracto de levadura o agua destilada estéril, como se indica en el **Cuadro 6**.

Cuadro 6. Composición de mezclas para infección oral

Componente	Tratamientos con Levadura	Tratamientos sin Levadura
Concentración bacteriana	180 ul	180 ul
Extracto de levadura	60 ul	0 ul
Agua destilada estéril	0 ul	60 ul
Azul brillante (1%)	10 ul	10 ul
Volumen total por inóculo	250 ul	250 ul

Se prepararon mezclas a partir de los tubos 1, 2 y 4 de la solución inicial ajustada a 1×10^8 UFC/ml (*S. Typhimurium* ATCC 23595 (LT2) y *S. Enteritidis* ATCC 13076 y control negativo) indicados en el cuadro 4, con extracto de levadura o agua destilada estéril más colorante azul brillante, según se indica en el cuadro 5. Los inóculos se depositaron en papel filtro estéril y posteriormente se colocaron en viales estériles de acuerdo a la metodología de (Hori et al., 2018). Este procedimiento para preparación de inóculos se realizó para todos los ensayos posteriores.

5.3.4 Preparación de organismos para infección oral

Para la infección oral se seleccionaron 150 organismos de los siguientes grupos: machos y hembras vírgenes de las estirpes *yw* y *ORR* de *D. melanogaster* bajo régimen alimenticio con levadura o alimento estándar (Flystock, 2019) y sin levadura (Kutzer et al., 2019). Los organismos se anestesiaron con hielo y se colocaron 15 por vial, en tubos vacíos estériles durante 2 h, para generar la condición de ayuno. Cada grupo experimental, fue desafiado con dos cepas de *S.*

enterica: *S. Typhimurium* ATCC 23595 (LT2) y *S. Enteritidis* ATCC 13076 y se utilizó caldo LB estéril para los controles negativos. La preparación de organismos para desafíos orales se realizó bajo este procedimiento, para los ensayos posteriores.

5.3.5 Protocolo de infección oral

El protocolo de infección oral se realizó de acuerdo a la metodología empleada por (Ferreira et al., 2014), donde los inóculos en el papel estéril se colocaron en viales estériles, donde se transfirieron los organismos previamente sometidos a ayuno durante dos horas, de acuerdo a lo reportado por (Hori et al., 2018). Los organismos permanecieron 2 h en exposición a los inóculos; después de la infección oral, se realizó el conteo y la selección de los organismos que presentaron tonalidad azul en la región ventral abdominal para su posterior análisis.

Posteriormente, los organismos seleccionados se transfirieron a nuevos viales con alimento estéril con y sin levadura, de acuerdo a su régimen alimenticio previo a la infección, para realizar posteriores observaciones y evaluaciones (Stevanovic et al., 2015). Para realizar dicha selección, los organismos se anestesiaron de acuerdo a la metodología 5.1.4. El protocolo de infección oral, se realizó bajo esta metodología para los ensayos posteriores.

5.4 Evaluación del comportamiento post-infección

Entre las medidas que describen el comportamiento y progresión de una enfermedad son mortalidad y morbilidad (Hernández & Kim, 2021); estos parámetros se midieron en las moscas infectadas conjuntamente con el comportamiento del patógeno. Una vez seleccionados los organismos infectados (organismos con superficie ventral abdominal con tonalidad azul), se realizaron

observaciones y registro de comportamiento relacionados a signos asociados a la infección: aletargamiento, ala extendida o dificultad para volar, dificultad para escalar y/o caminar, como caracteres descriptivos de la morbilidad; además, se registró la mortalidad de los organismos ante la infección; así como la replicación del patógeno en el hospedero.

5.4.1 Ensayo de Sobresalto

La morbilidad se define como el estado de ser sintomático debido a una enfermedad o afección (Hernández & Kim, 2021). Para este caso, de acuerdo a la metodología de (Gaitanidis et al., 2019), se realizó la evaluación del estado físico de los organismos mediante un ensayo de sobresalto a través de la respuesta motora individual ante la estimulación mecánica. Esta estimulación fue generada mediante 3 – 5 golpes suaves con un lapso de 1 segundo entre cada uno. Los organismos de cada desafío oral se sometieron a este ejercicio y se grabaron los 5 s siguientes a cada estimulación; de esta forma se asignaron puntajes de categorización para cada comportamiento de acuerdo con la matriz presentada en el **Cuadro 7**. El ensayo de sobresalto se realizó cada 24 h, durante seis días y los conteos se realizaron por triplicado.

Cuadro 7. Matriz de categorización para sobresalto

Puntaje	Condición física
8	Vuelo
7	Salto
6	Mosca totalmente capaz de escalar realizando caminata.
5	Deterioro leve para trepar.
4	La mosca ha adquirido un déficit para trepar (p.e. arrastra la pierna).
3	La mosca apenas puede trepar (pocos mm), se cae regularmente de la pared del vial.
2	Dificultad grave para trepar, realiza respuestas inesperadas, camina en círculos, coma que dura segundos, agresividad, ataque.
1	Etapa terminal: Mosca moribunda y en postura de muerte (mayormente boca arriba, en decúbito supino).

Fuente: (Gaitanidis et al., 2019)

5.4.2 Ensayo de Supervivencia

La mortalidad, relacionada con el número de muertes causadas por el evento investigado, puede determinarse con la ausencia de respuesta al estímulo en los organismos desafiados o infectados (Hernández & Kim, 2021); además, también puede considerarse un indicador del potencial de virulencia que posee el patógeno, en este caso, *S. enterica*. Es por ello que una vez que los organismos (hembras y machos vírgenes bajo régimen de alimentación con y sin levadura, de las estirpes yw y ORR) se han sometido al desafío oral, se realizó el monitoreo con la finalidad de evaluar la supervivencia, de acuerdo a la metodología reportada por (Hori et al., 2018), donde se realizaron conteos de los organismos

vivos para cada tratamiento. Este ensayo se realizó por triplicado cada 24 h durante seis días posteriores a la infección oral, para cada tratamiento.

5.4.3 Ensayo de Replicación

La interacción entre agentes infecciosos y el sistema inmunológico puede implicar la inoculación del patógeno en un hospedero receptivo, la infección exitosa de las células “diana” y la replicación del patógeno en células del hospedero (NPG, 2006). Durante el desarrollo de esta infección, la replicación del patógeno en la interacción patógeno – hospedero es un indicador de éxito para *S. enterica*. Por este motivo, es importante monitorear este comportamiento a lo largo de los desafíos de infección en *D. melanogaster*.

El ensayo de replicación de *S. enterica* se realizó a los días 0, 2, 4, 6 y 8 posteriores a la infección oral. Para el conteo de UFC durante el proceso de infección oral, los organismos que presentaron la superficie ventral abdominal azul fueron depositados en viales con nuevo alimento estéril de acuerdo con el procedimiento 5.3.5. Posteriormente, los organismos se anestesiaron y se conjuntaron en grupos de tres organismos, cada grupo de tres organismos se consideró una muestra. En este ensayo se analizaron 4 muestras por cada tratamiento en cada desafío oral.

Una vez anestesiados, los organismos se colocaron en grupos de tres organismos anestesiados en tubos eppendorf, que contenían 500 ul de etanol al 70%, de acuerdo a la metodología reportada por (Kutzer et al., 2019), para realizar enjuagues de los organismos. De esta manera, se retiró el etanol del primer enjuague y se agregó 500 ul de agua destilada estéril para el segundo enjuague, posteriormente se retiró el agua destilada estéril y se adicionaron 200 ul de SSF.

Para los conteos en placa se utilizó la metodología reportada por (Siva-Jothy et al., 2018), bajo algunas modificaciones: los organismos contenidos en SSF se maceraron con pinzas estériles y la mezcla resultante se homogeneizó con vórtex.

A partir esta mezcla se realizaron microdiluciones seriadas, se tomaron 100 ul de la mezcla inicial y se colocaron en 900 ul de SSE, se homogenizó la mezcla mediante vórtex y se tomaron nuevamente 100 ul de esta mezcla depositándolos en 900 ul de SSE: estas diluciones se realizaron 5 veces. Posteriormente, se realizó siembra por goteo (10 ul) en placa XLD + N a partir de la muestra directa hasta la quinta dilución, por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Transcurrido este periodo, se realizó conteo de las colonias con morfología característica de *Salmonella* (Siva-Jothy et al., 2018).

5.4.4 Confirmación molecular de *S. enterica* contenida en *D. melanogaster* durante la infección oral.

A partir de las colonias recuperadas en el ensayo 3.4.3 se realizó la confirmación molecular de *Salmonella* de acuerdo a la metodología reportada por (Esquivel-Hernández, 2019); las colonias con morfología característica se inocularon en caldo soya tripticaseína y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Se tomaron 56 muestras al azar y posteriormente, se tomó 1 ml de este cultivo y se realizó la extracción de ADN genómico mediante el kit Quick-gDNA™ Miniprep. Se midió la calidad del ADN extraído mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 y se realizó el ajuste a una concentración de 5ng/ul.

Se realizó la reacción de PCR para los genes específicos de *Salmonella*, *invA* y *16S rRNA* de acuerdo al protocolo estandarizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la UAQ para un volumen de reacción de 17 ul. Las condiciones de amplificación se presentan en el **Cuadro 8**.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador c1000 Touchcycler Biorad. Se realizó electroforesis a los productos resultantes de la reacción, utilizando geles de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Las condiciones de corrida electroforética fueron a 90 V durante 30 min. Las bandas amplificadas fueron visualizadas mediante un transiluminador de luz UV (Bio-imagen System Pro-DnR).

Cuadro 8. Condiciones de amplificación para detección de *Salmonella*

Fase	<i>invA</i>	<i>16S rRNA</i>
Desnaturalización inicial	94°C / 3min	94°C / 3 min
Ciclos	35	32
Desnaturalización	94°C / 30 s	94°C / 20 s
Alineamiento	57.4 °C / 30 s	53°C / 30 s
Elongación	72°C / 30 s	72°C / 30 s
Elongación final	72°C / 5min	72°C / 2 min

Fuente: (Esquivel-Hernández, 2019)

5.4.5 Ensayo de actividad locomotora

En *D. melanogaster*, los ritmos diarios de los fenómenos fisiológicos y de comportamiento, conocido como ritmo circadiano, pueden asociarse con enfermedad o trastornos; la lectura del comportamiento circadiano estándar medida en *Drosophila* es la actividad locomotora y se realiza mediante un sistema de monitoreo (Chiu et al., 2010). El sistema Trikinetics *Drosophila* Activity Monitoring (DAM) se utiliza comúnmente para investigar los ritmos de locomoción en *Drosophila*. Este sistema envía rayos infrarrojos a través del centro de un vial y

monitorea la actividad de locomoción analizando el número de interrupciones del haz infrarrojo en períodos de 1 a 5 min (Shaw et al., 2018).

Para realizar este ensayo, se seleccionaron hembras vírgenes de la estirpe ORR bajo régimen de alimentación sin levadura; se realizó la selección y preparación de organismos de acuerdo con los protocolos previamente descritos. Posteriormente, se realizó el desafío oral según el protocolo 5.3.5; las cepas seleccionadas para la infección oral son *S. Typhimurium* como control positivo, dos aislamientos recuperados de carne de pollo y caldo LB estéril como control negativo, estos se presentan en el **Cuadro 5**, con $n = 8$ por tratamiento. Se realizó la selección de organismos infectados y estos fueron depositados de manera individual en tubos de vidrio Pyrex Glass, que en un extremo contenían alimento estéril y en el otro, una tapa de algodón estéril (Woods et al., 2014).

Este monitoreo se realizó en el Bioterio del Laboratorio donador de los ejemplares iniciales de *D. melanogaster*, utilizados en los ensayos. De acuerdo a (Chiu et al., 2010), los tubos se colocaron en los monitores de actividad (Trikinetics DAM2); se verificó el software y recopilación de datos del sistema DAM. Los organismos permanecieron a 25 °C en fase oscura (DD). La locomoción se controló durante un mínimo de 3 días después de un período de "asentamiento" de 24 h (Shaw et al., 2018) y los datos recolectados en código binario por el Sistema DAM, fueron procesados por el software Shyni-R-DAM.

5.4.6 Análisis estadísticos

Todos los datos cuantitativos se obtuvieron a partir de tres ensayos independientes, considerando a cada individuo como unidad experimental para los ensayos de infección oral, supervivencia, sobresalto y actividad locomotora. Sin embargo, para los ensayos de replicación del patógeno en el hospedero, la unidad experimental corresponde a un grupo de tres organismos. Asimismo, los resultados son reportados por medio de un ANOVA comparando las medias \pm la desviación estándar del error,

en los ensayos de infección oral (consumo de inóculo), replicación y sobresalto. Se realizó prueba de comparación de medias Fisher en los ensayos de consumo de inóculo y comparación de medias de Tukey para los ensayos de replicación y sobresalto. Para los ensayos de supervivencia, se utilizó la prueba de Mantel-Cox y el ANOVA unidireccional ordinario de los datos, para determinar los valores de p . Las diferencias se consideran estadísticamente significativas si el valor de $p < 0.05$.

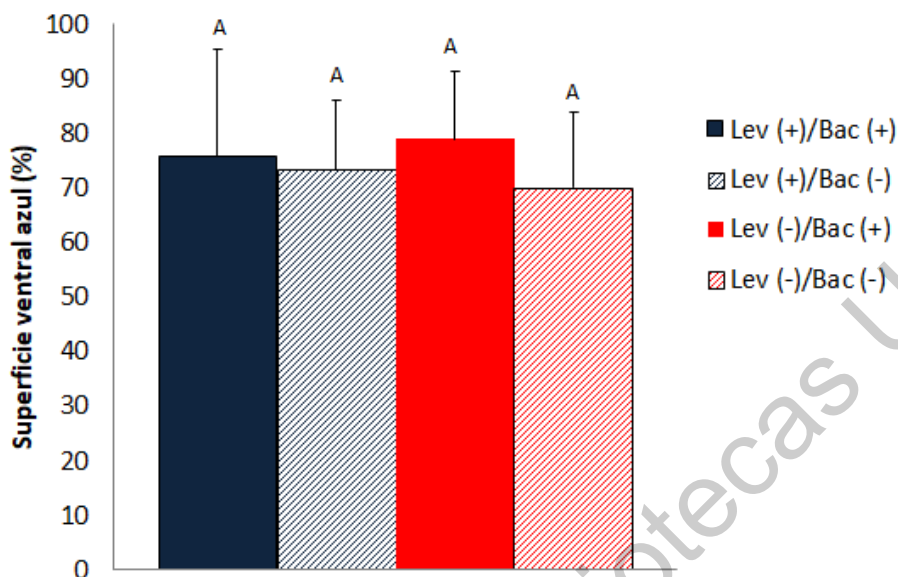
Dirección General de Bibliotecas UNQ

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Establecimiento del modelo de infección

Anteriormente se han reportado estudios sobre el uso de *D. melanogaster* como sistema modelo para ensayos de infección con *Salmonella*. En nuestro caso, esta investigación aborda la caracterización de las estirpes silvestres como referencia en la infección oral, ya que en otras investigaciones reportadas se emplean cepas mutantes de *D. melanogaster*, susceptibles a la infección (Khalil et al., 2015; Pava-Ripoll et al., 2015). Además, se busca dilucidar si una nueva dieta sin levadura podría ser consumida por las moscas o si los ingredientes, principalmente la levadura, en la formulación del alimento podría influir en el mantenimiento de los organismos o en la infección oral (Hoang et al., 2015). Lo anterior debido a que se ha reportado que algunas adhesinas en *Saccharomyces cerevisiae* pueden favorecer el proceso de adhesión celular de *S. enterica* (Gut et al., 2018).

De esta forma, en el primer desafío se evaluó el número de organismos bajo régimen de alimentación con y sin levadura de las estirpes *yw* y *ORR* que fueron capaces de consumir los inóculos de *S. Typhimurium* y *S. Enteridis*. Durante el análisis de los organismos bajo régimen de alimentación con levadura [Lev (+)] y sin levadura [Lev (-)] que consumieron los inóculos en papel filtro con bacterias [Bact (+)] y sin bacterias [Bact (-)], se observó que la dieta no tiene un efecto sobre el consumo de inóculo ($p > 0.05$); por lo tanto, es viable el uso de alimento Lev (+) y Lev (-) en el sistema modelo *D. melanogaster*. De igual manera, se observa que aproximadamente el 75% de los organismos consumieron los inóculos Bact (+) y Bact (-) (**Gráfica 1**), lo que indica que los niveles de consumo de inóculo son los esperados, de acuerdo al estudio de Hori et al. (2018) quien reportó un consumo de inóculo cercano al 80% para la infección oral con enterobacterias utilizando papel filtro.

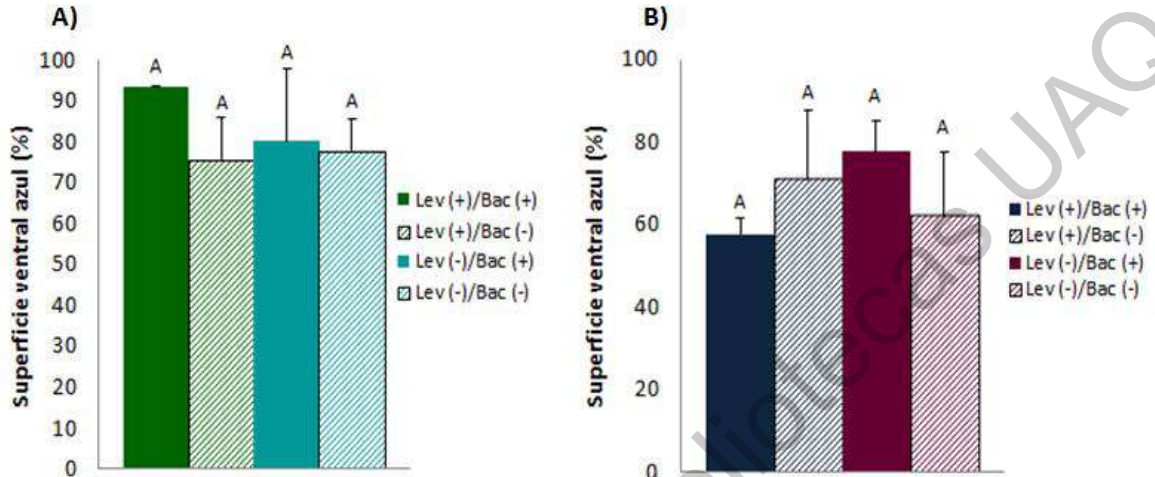


Gráfica 1. Consumo de inóculo por régimen alimenticio

El eje Y indica los porcentajes de la población que ingirieron el inóculo, las barras azules refieren al régimen alimenticio con levadura y las barras rojas al régimen alimenticio sin levadura, las barras intermitentes refieren a inóculo sin bacteria para ambas dietas. No se observa diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Por otra parte, existe evidencia que documenta la capacidad de *D. melanogaster* para detectar metabolitos producidos por algunos patógenos como *Salmonella*, y de esta manera, repeler y evitar su ingesta, o en su defecto inducir respuestas inmunitarias tempranas en el hospedero (Capo et al., 2016; Keeseey et al., 2017). Es por ello que se evaluó el número de organismos de ambas estirpes (*yw* y ORR) que fueron capaces de consumir los inóculos bacterianos de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* una vez que se sometieron a un proceso de ayuno (Hori et al., 2018). En el consumo de *S. Typhimurium* (**Gráfica 2**) por la estirpe *yw* se observa que más del 80% de los organismos consumieron el inóculo que contiene bacterias y no se observan diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p > 0.05$). Asimismo, para la estirpe ORR se observa que aproximadamente el 80% de

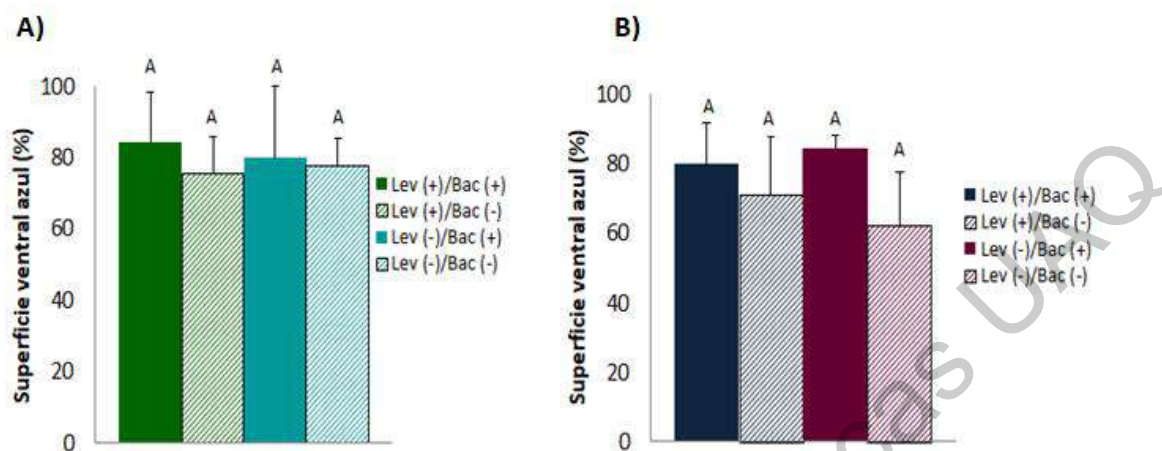
organismos consumieron el inóculo con bacterias y no se observan diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p > 0.05$).



Gráfica 2. Consumo de inóculo *S. Typhimurium* por estirpe.

A) estirpe yw, B) estirpe ORR. Las barras sólidas corresponden a consumo de inóculo que contiene bacterias; barras con líneas intermitentes, controles negativos, inóculo sin bacterias. No se observa diferencia estadística significativa para estos tratamientos ($p > 0.05$) en ambas estirpes.

De igual forma, se observó un efecto similar en el consumo de inóculo que contenía *S. Enteritidis* (**Gráfica 3**). En la estirpe yw se observa que aproximadamente el 80% de los organismos consumieron el inóculo que contiene bacterias y no se observan diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p > 0.05$). Lo mismo sucede para la estirpe ORR, donde se observa que aproximadamente 80% de los organismos consumieron el inóculo con bacterias y no se observan diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p > 0.05$).



Gráfica 3. Consumo de inóculo *S. Enteritidis* por estirpe.

A) estirpe yw, B) ORR. Las barras sólidas corresponden a consumo de inóculo que contiene bacterias; barras con líneas intermitentes, controles negativos, inóculo sin bacterias. No se observa diferencia estadística significativa para estos tratamientos ($p > 0.05$) en ambas estirpes.

De esta manera, se puede decir que es viable el mantenimiento de las estirpes yw y ORR bajo régimen alimenticio sin levadura como lo sugiere Grangeteau et al. (2018) que reporta sobrevivencia (durante 40 días) en aproximadamente el 90% de organismos *D. melanogaster* con dieta sin levadura. Por otro lado, se puede decir que no hay rechazo en el consumo de *Salmonella* presente en el inóculo, lo que contrasta con lo reportado por Soldano et al. (2016), que señala la evitación gustativa del LPS en *D. melanogaster*, sin embargo, Keesey et al. (2017) reporta que los organismos de la estirpe silvestre de *D. melanogaster* se sienten significativamente más atraídas por moscas infectadas por enterobacterias en comparación con moscas sanas atribuyendo este efecto a señales olfativas entre los organismos. Por último, puede sugerirse que los niveles de organismos con ingesta de bacterias son los esperados de acuerdo a lo reportado por (Hori et al., 2018) (80% de la población consume inóculos contenidos en papel filtro). Además, que el régimen de alimentación previo a la infección oral en *D. melanogaster* no afecta el consumo de inóculo cuando los organismos se han sometido a ayuno.

Sin embargo, se desconoce si las dietas con levadura y sin levadura tienen efecto en la invasión de *S. enterica* en *D. melanogaster* (Howick & Lazzaro, 2014), por lo que se debe continuar con la realización de estudios que permitan determinar tal efecto.

6.2 Evaluación de condiciones para la infección oral

A partir del establecimiento del modelo se estandarizó la vía de infección oral con *S. enterica* en las estirpes *yw* y *ORR* de *D. melanogaster*. Se sugiere que la inoculación a través del papel filtro es factible para la infección oral; además se comprobó que *D. melanogaster* no rechaza el consumo de *S. enterica* y que el régimen alimenticio no influye en el consumo de inóculo que contiene bacterias. Sin embargo, existe evidencia que señala que la adhesión de *S. Typhimurium* con levaduras se asocia a la presencia de adhesinas y receptores específicos de manosa, como las fimbrias en las paredes celulares de *Salmonella*, que pueden unirse a la manosa de las paredes celulares de las levaduras mediante mosaicos de proteínas en la superficie de las paredes celulares y que participan en el desarrollo, simbiosis y patogenia de esta bacteria (Gut et al., 2018), razón por la que se desconoce si la dieta (Lev +/-) de *D. melanogaster* influye en la replicación de *S. enterica* (Howick & Lazzaro, 2014) una vez que el patógeno ha ingresado al tracto intestinal del hospedero.

6.2.1 Relación entre la dieta previa a la infección oral y la susceptibilidad en *D. melanogaster* ante el desafío con *S. enterica*

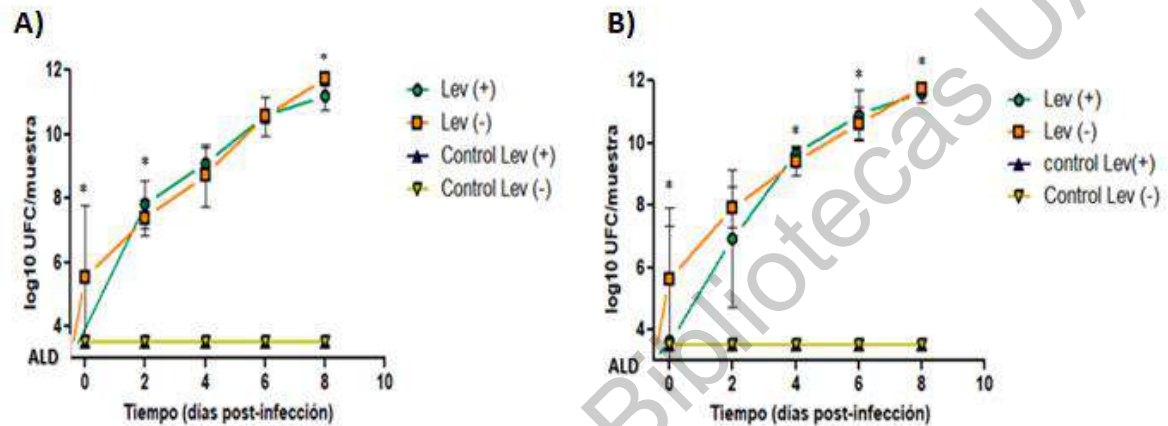
Para este ensayo se seleccionaron 8 grupos de 150 organismos cada uno, bajo régimen de alimentación Lev (+) y Lev (-), machos y hembras de las estirpes *yw* y *ORR*. En este desafío se descartaron los machos y hembras de las estirpe *yw* bajo régimen de alimentación Lev (+), debido a que se observó reducción en el

nivel reproductivo bajo las condiciones del laboratorio estandarizadas; resultando de esta manera 6 grupos de organismos para el ensayo. Se realizaron tres rondas de infección, de acuerdo con la metodología del apartado 5.3.5 donde se colocaron 10 organismos por cada vial, en 5 viales para cada tratamiento; los tratamientos son *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y Caldo L – B estéril como control negativo. El ensayo se realizó por cuadruplicado de manera independiente. El experimento tuvo una duración de 8 días, y las mediciones de UFC se realizaron cada 48 h, es decir, a los días 0, 2, 4, 6 y 8 días posteriores a la infección, empleando un vial independiente para cada día de medición. Los conteos de UFC se realizaron agrupando los organismos en muestras de 3 mosquitas: para cada tratamiento se obtuvieron 4 réplicas, generando un total de 96 muestras para cada día de conteo.

Se evaluó si la dieta previa a la infección oral tiene efecto en la replicación del patógeno en el hospedero; en general, se pudo observar que tanto en el desafío con *S. Enteritidis* como en el desafío con *S. Typhimurium*, se recuperaron mayores conteos de UFC ($> 5 \log_{10}$ UFC/muestra) para los organismos bajo régimen de alimentación previo a la infección Lev (-) a partir de la hora 0 posterior a la infección oral (**Gráfica 4**).

Respecto al desafío con *S. Enteritidis*, se observa que existe diferencia estadística significativa entre las dietas Lev (+) y Lev (-) en los días 0, 2 y 8 posteriores a la infección ($p < 0.05$), presentando mayores recuentos de este serotipo de *Salmonella* en los organismos bajo régimen de alimentación Lev (-) ($> 5 - 12$ UFC/muestra) que en los organismos bajo régimen de alimentación Lev (+) ($ALD - 11 \log_{10}$ UFC/muestra). Por otro lado, en los organismos desafiados con *S. Typhimurium*, existe diferencia estadística significativa entre ambas dietas a los días 0, 4, 6 y 8 posteriores a la infección oral ($p < 0.05$); de la misma forma, se presentan mayores recuentos en los organismos bajo régimen de alimentación previo a la infección oral sin levadura, Lev (-) ($> 5 - 11$ UFC/muestra) que en los organismos con Lev (+) ($ALD - 11 \log_{10}$ UFC/muestra); puede observarse

también que en este desafío al día 8 posterior a la infección oral, los conteos de UFC son muy similares (~11 log₁₀ UFC/muestra) entre los organismos para ambos dietas previas a la infección oral.

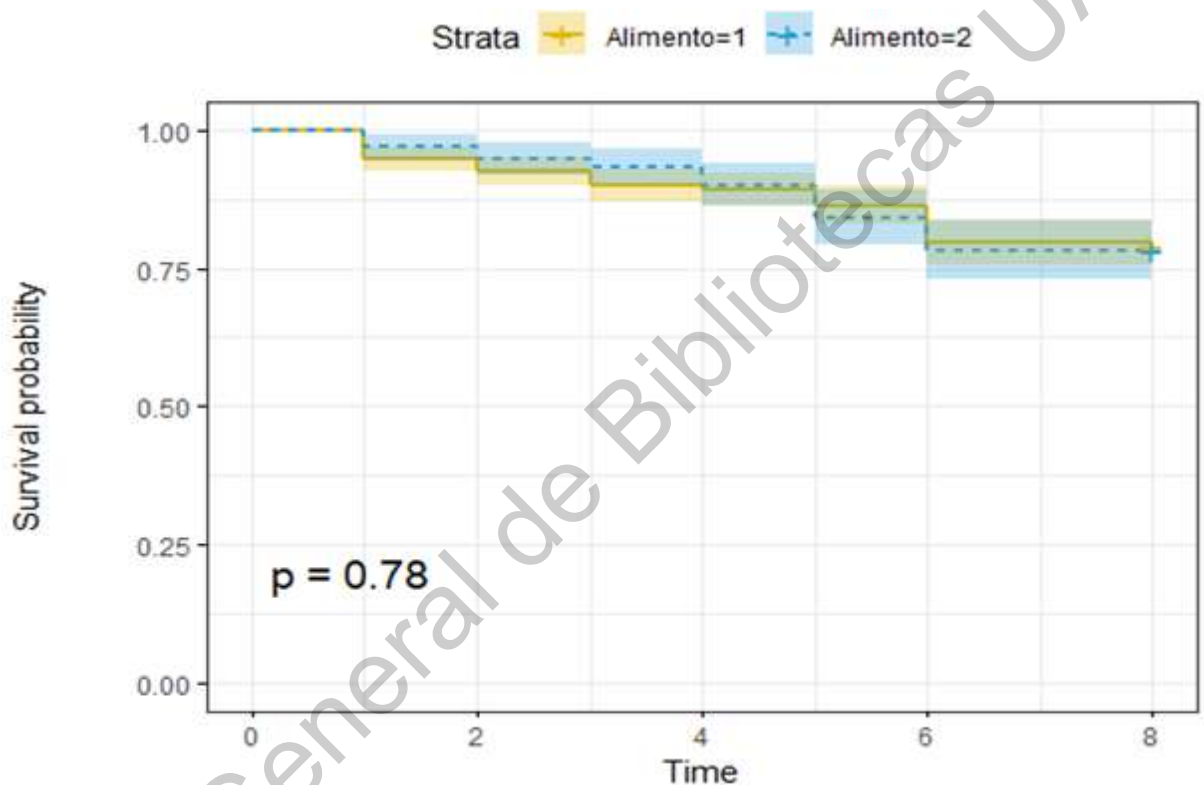


Gráfica 4 Replicación del patógeno en el hospedero de acuerdo con régimen alimenticio de *D. melanogaster*

Comparación por régimen alimenticio previo al desafío oral Lev (+) y Lev (-) en infección con A) *S. Enteritidis* y B) *S. Typhimurium*. Líneas verdes corresponden Lev (+); líneas naranjas a Lev (-). Los controles (líneas amarillas y azules) corresponden a inóculo con caldo LB estéril. ALD: Abajo del Límite de Detección=1000 células/muestra. Experimentos realizados por triplicado. *Diferencia estadística significativa (p < 0.05).

Para evaluar el efecto de la dieta sobre la infección oral en *D. melanogaster*, también se realizó el ensayo de supervivencia, mediante el monitoreo de organismos vivos cada 24 h a lo largo de la infección (**Gráfica 5**). En este análisis pudo observarse un comportamiento similar en la supervivencia (> 75%) de los organismos bajo régimen de alimentación Lev (+) y Lev (-) previo a la infección oral. Mediante el análisis de Mantel – Cox, no se observa diferencia estadística significativa (p < 0.05); entre la supervivencia de organismos infectados bajo

régimen de alimentación Lev (+) previo a la infección y con los organismos infectados y con régimen de alimentación Lev (-) previo a la infección oral; lo que sugiere que la dieta previa a la infección oral no tiene efecto en la supervivencia de *D. melanogaster* para las estirpes *yw* y ORR cuando son desafiadas con *S. enterica*.



Gráfica 5. Efecto de la dieta en la supervivencia de *D. melanogaster* ante el desafío oral.

Comparación por régimen alimenticio previo a la infección oral Lev (+) y Lev (-). Línea amarilla corresponde a alimento Lev (-), mientras que la línea azul corresponde al alimento Lev (+). No existe diferencia estadística significativa en análisis de supervivencia de Mantel-Cox ($p > 0.05$).

En conjunto, estos resultados sugieren que el régimen alimenticio previo a la infección oral no tiene efecto en la supervivencia de las estirpes *yw* y ORR de *D. melanogaster* ($p > 0.05$); sin embargo, dichas dietas sí pueden tener efecto en la

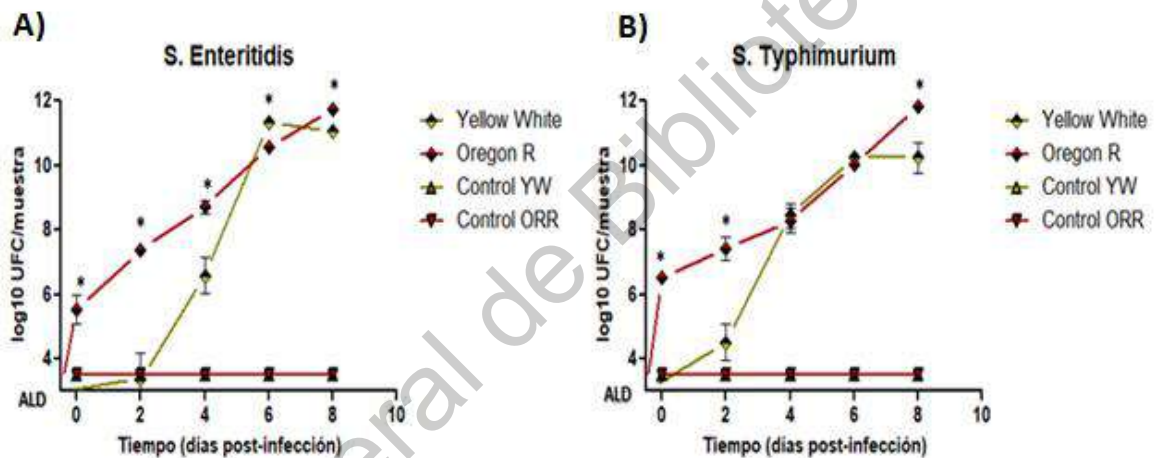
replicación del *S. enterica* en el hospedero a lo largo de la infección ($p < 0.05$), lo que coincide con lo reportado por (Eleftherianos et al., 2014) en desafíos de infección con *E. coli*. Esto puede deberse a que en los organismos bajo dieta complementada con levadura, la adhesión de *S. enterica* se da con las paredes de las células de la levadura limitando de esta manera la internalización e infectividad del patógeno, ya que la levadura no se une al tracto gastrointestinal y puede ser excretada en heces (Hatoum et al., 2012; Stier & Bischoff, 2017). Por otra parte, en el caso de los organismos con dieta sin levadura previa a la infección, puede sugerirse que la replicación de *S. enterica* se mostró favorecida debido a que el cambio de dieta puede afectar o reducir la microbiota de *D. melanogaster*, misma que se considera barrera de defensa contra patógenos (Apidianakis & Rahme, 2009; Padilla, 2016).

6.2.2 Relación entre las estirpes yw y ORR y la susceptibilidad del hospedero ante la infección oral con *S. enterica*

En el análisis para evaluar si la estirpe tiene efecto en la replicación de *S. enterica* en *D. melanogaster*, se pudo observar que tanto en el desafío con *S. Enteritidis* como en el desafío con *S. Typhimurium*, se recuperaron mayores conteos de UFC para la estirpe ORR ($> 4 \log_{10}$ UFC/muestra) a partir del día 0 posterior a la infección oral (**Gráfica 6**).

En el desafío con *S. Enteritidis*, se observa que existe diferencia estadística significativa entre la estirpe yw y ORR a lo largo de 8 días posteriores a la infección oral ($p < 0.05$), presentando mayores recuentos de este serotipo de *Salmonella* en la estirpe ORR ($> 4 - 12 \log_{10}$ UFC/muestra) que en la estirpe yw (ALD - $10 \log_{10}$ UFC/muestra). Sin embargo, en el desafío con *S. Typhimurium*, existe diferencia estadística significativa entre ambas estirpes a los 0, 2 y 8 días posteriores a la infección oral ($p < 0.05$), presentando recuentos muy similares en los días 4 y 6 de infección ($p > 0.05$). En este caso, de manera similar al desafío

con *S. Enteritidis*, la estirpe ORR (6 – 12 log₁₀ UFC/muestra) también presentó mayores recuentos que *yw* (ALD – 10 log₁₀ UFC/muestra). Estos resultados coinciden con lo reportado por (Eleftherianos et al., 2014), donde las estirpes ORR y *yw* presentaron un mayor crecimiento de enterobacterias en comparación con otras estirpes en evaluación. El efecto de la estirpe en la replicación de *S. enterica* ($p < 0.05$) puede asociarse a la presunta reducción en la melanización ante patógenos que presenta la estirpe de referencia (Massey, 2019).

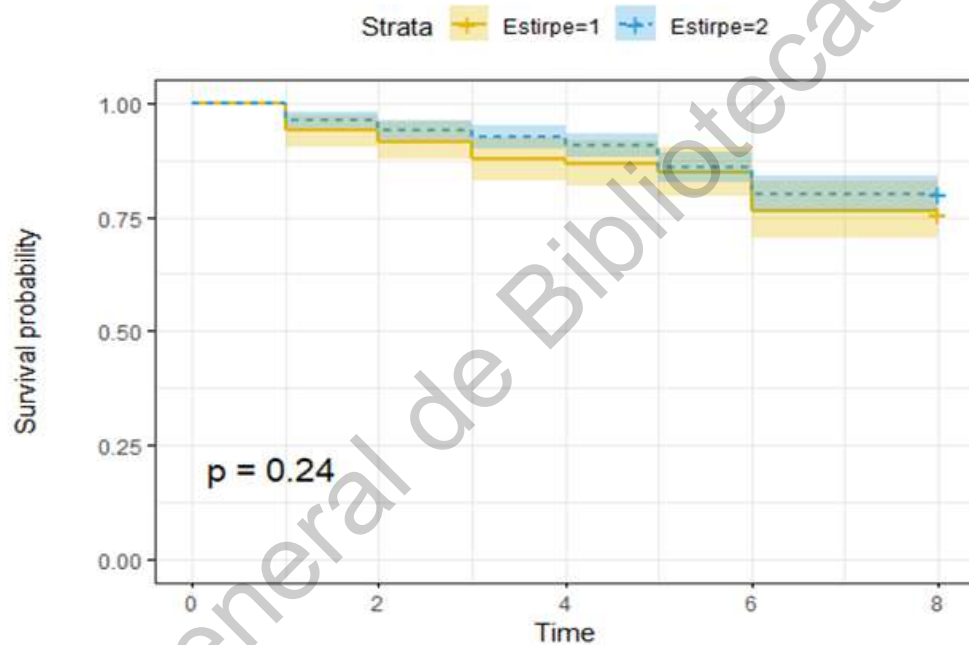


Gráfica 6. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por estirpes yw y ORR.

Infección con A) *S. Enteritidis* y B) *S. Typhimurium*. Líneas amarillas corresponden a estirpe *yw*; líneas rojas a ORR. Los controles corresponden a inóculo con LB estéril. ALD: Abajo del Límite de Detección=1000 células/muestra. Experimentos realizados por triplicado. *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Por otra parte, en el ensayo de supervivencia se realizaron conteos de los organismos sobrevivientes después de la infección oral, cada 24 h, a partir del día 0 y hasta el día 8. En este ensayo se observó un comportamiento similar en la supervivencia (> 75%) tanto en la estirpe *yw* (estirpe 1) como en ORR (estirpe 2) (**Gráfica 7**). En esta comparación no hay diferencia estadística significativa con el

análisis de Mantel – Cox ($p > 0.05$); estos resultados coinciden con el reporte de (Eleftherianos et al., 2014) donde los organismos infectados con *E. coli* mediante microinyección presentaron una supervivencia superior al 70% de la población infectada en las estirpes *yw* y ORR. Esto sugiere que la estirpe no tiene efecto en la supervivencia del hospedero ante la infección con *S. enterica* ($p > 0.05$); por lo tanto, ambas estirpes de *D. melanogaster* son viables para ensayos de supervivencia en desafíos de infección oral con *S. enterica*.

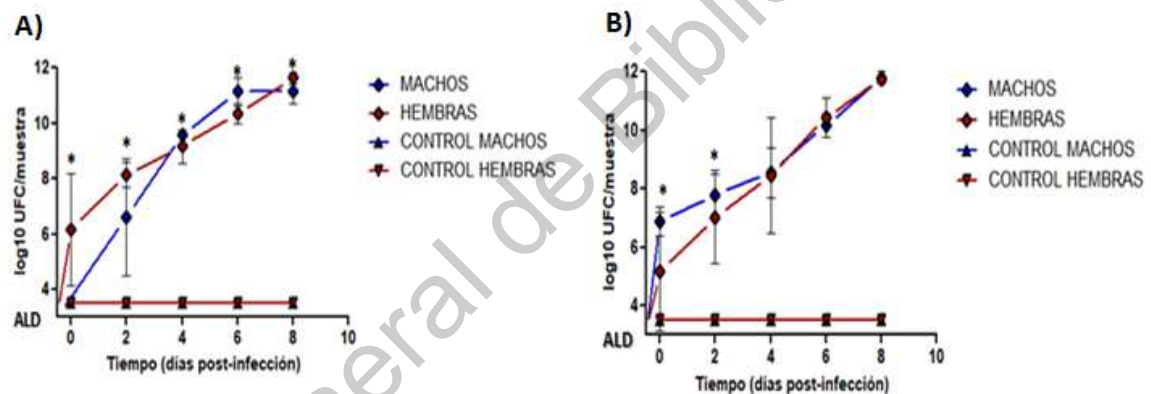


Gráfica 7. Análisis de supervivencia. Comparación por estirpe.

Estirpe 1: Línea amarilla corresponde a estirpe *yw*; estirpe 2: Línea azul, ORR. No existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) con análisis de supervivencia de Mantel –Cox.

6.2.3 Relación entre el sexo de *D. melanogaster* y su susceptibilidad en la infección oral con *S. enterica*

En el análisis para evaluar si el sexo (macho/hembra) tiene un efecto en la replicación de *S. enterica* en *D. melanogaster* (**Gráfica 8**), se pudo observar que en los organismos con régimen de alimentación previa a la infección oral Lev (+), la replicación de *Salmonella* es evidente en hembras desde el día 0 posterior al desafío oral ($> 6 \log_{10}$ UFC/muestra), mientras que en machos, tal replicación es revelada hasta el día 2 posterior a la infección oral ($> 6 \log_{10}$ UFC/muestra). Se observa diferencia estadística significativa en los días 0, 2, 4, 6, y 8 posterior a la infección oral ($p < 0.05$).



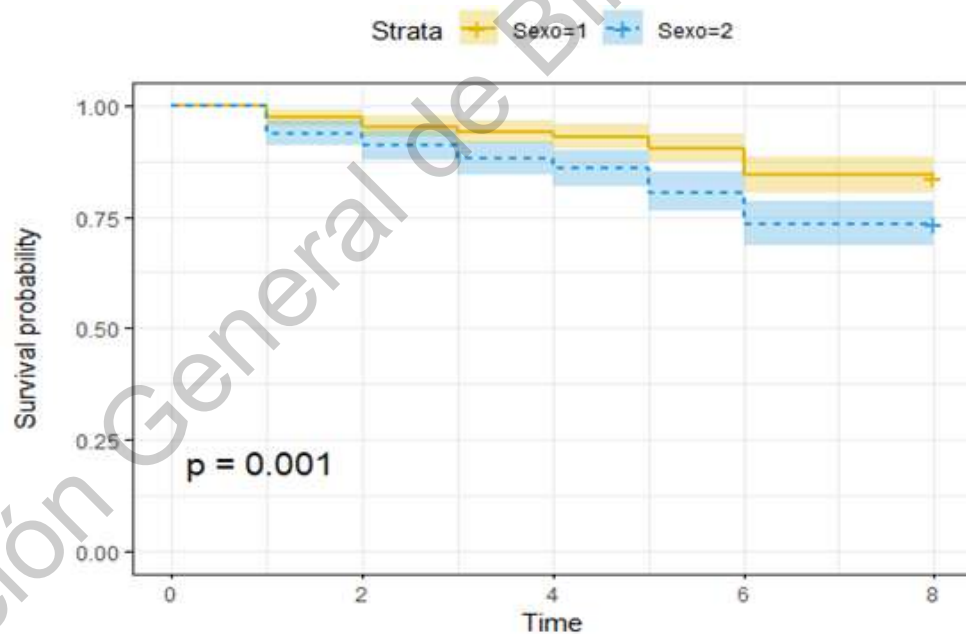
Gráfica 8. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por sexo en ORR

Organismos bajo régimen de alimentación A) Lev (+) y B) Lev (-). Línea azul machos; línea roja, hembras. Los controles corresponden a inóculo con caldo LB estéril. ALD: Abajo del Límite de Detección=1000 células/muestra. Experimentos realizados por triplicado. *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Respecto a los organismos con régimen de alimentación previa a la infección oral Lev (-), la replicación de *S. enterica* es notable tanto en machos ($> 5 \log_{10}$ UFC/muestra) como en hembras ($> 6 \log_{10}$ UFC/muestra) a partir del día 0 posterior a la infección. Sin embargo, solo se observa diferencia estadística

significativa en los días 0 y 2 posterior a la infección oral ($p < 0.05$). Las cargas del patógeno en hembras oscila entre ~ 5 y $\sim 12 \log_{10}$ UFC/muestra; en machos esta carga oscila entre ALD a $\sim 11 \log_{10}$ UFC/muestra, resultados que coinciden con lo reportado por (Belmonte et al., 2020), donde las hembras presentan mayores cargas bacterianas que los machos en desafíos con enterobacterias.

Además, en este ensayo de supervivencia (**Gráfica 9**) se presenta una mayor supervivencia en machos ($> 80\%$) en comparación con hembras ($< 75\%$). En el análisis de Mantel – Cox se observa que hay diferencia estadística significativa entre las supervivencias de machos y hembras ($p < 0.05$); por lo tanto, el sexo de los organismos desafiados sí tiene un efecto en la susceptibilidad del hospedero.



Gráfica 9. Análisis de supervivencia. Comparación por sexo

La línea amarilla corresponde a machos (sexo 1), mientras que la línea azul corresponde a hembras (sexo 2). Se observa diferencia estadística significativa entre sexos ($p < 0.05$) por análisis de supervivencia de Mantel-Cox.

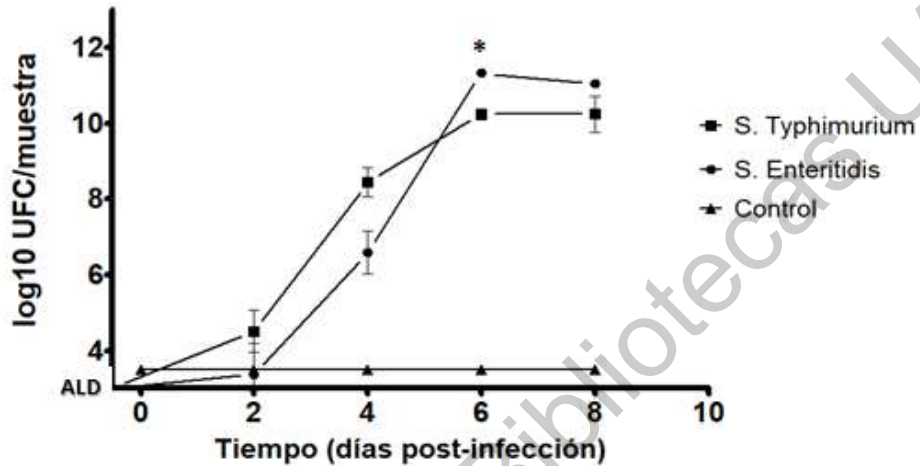
Estos resultados que concuerdan con los reportes de (Kutzer et al., 2019; Belmonte et al., 2020), que señalan a las hembras de *D. melanogaster* como los organismos más susceptibles ante infecciones por enterobacterias patógenas. Tal efecto puede atribuirse al genotipo del hospedero y al costo de respuesta inmunitaria que representa para las hembras en etapa reproductiva (Contreras-Garduño et al., 2014).

6.2.4 Efecto del inóculo de *S. enterica* en la susceptibilidad *D. melanogaster* en la infección oral

Finalmente, en la evaluación de condiciones durante los desafíos orales se evaluó también el efecto de los inóculos de *S. enterica* en la interacción patógeno-hospedero (**Gráfica 10**). Puede observarse un comportamiento muy similar en la replicación de las dos cepas de *Salmonella* durante el transcurso del ensayo, del día 0 al 8 posterior al desafío oral (ALD - $\sim 10 \log_{10}$ UFC/muestra). En el día 0 puede observarse la replicación de *S. Typhimurium* por encima del límite de detección ($> 3 \log_{10}$ UFC/muestra); mientras que *S. Enteritidis* se evidencia a partir del día 2 posterior a la infección ($> 3 \log_{10}$ UFC/muestra). Para el día 8, en ambas cepas se alcanzó $> 10 \log_{10}$ UFC/muestra. Sólo se observó diferencia estadística significativa al día 6 posterior a la infección oral ($p < 0.05$).

No obstante, en el ensayo de supervivencia, existe un efecto en la supervivencia de los organismos desafiados con las cepas de *S. enterica* ($p < 0.05$); se observa menor supervivencia de los organismos infectados con *S. Typhimurium* ($< 75\%$) que los organismos infectados por *S. Enteritidis* ($> 80\%$); el control negativo presentó una supervivencia cercana al 90% de la población (**Gráfica 11**). Estos resultados coinciden con lo reportado por Brandt et al. (2004), donde reporta que *S. enterica*, inoculada en *D. melanogaster* mediante microinyección, es capaz de provocar mortalidad en las moscas a partir cargas bacterianas muy bajas (1×10^4 –

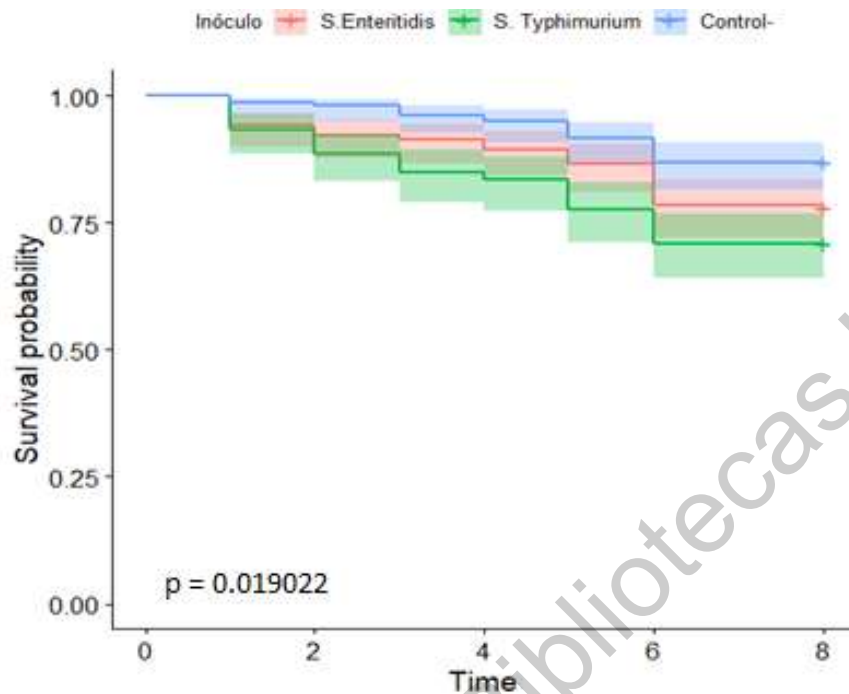
1x10⁵ UFC), y estas mortalidades pueden generarse en un plazo de 7 a 9 días cuando los organismos son resistentes a dicha infección.



Gráfica 10. Replicación del patógeno en el hospedero. Comparación por inóculo

Los símbolos en círculo corresponden a *S. Enteritidis*; cuadrados a *S. Typhimurium* y triángulos al control (inóculo con caldo LB estéril). ALD: Abajo del Límite de Detección = 1000 células/muestra. Experimentos realizados por triplicado. *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

A partir de los ensayos realizados en esta sección y para estudiar las interacciones patógeno–hospedero con cepas recuperadas de carne de pollo, se decidió realizar los ensayos posteriores con organismos, machos y hembras vírgenes, de la estirpe ORR bajo régimen de alimentación Levadura (-). Además, se seleccionó la cepa *S. Typhimurium* como control positivo.



Gráfica 11. Análisis de supervivencia. Comparación por inóculo en desafío de infección

La línea rosa corresponde a *S. Enteritidis*; línea verde a *S. Typhimurium*; línea azul a caldo LB (control). En el análisis de supervivencia de Mantel-Cox se observa una diferencia estadística significativa en la comparación por inóculos empleados en el desafío oral ($p < 0.05$).

6.3 Confirmación molecular de *Salmonella* recuperada en los desafíos orales

Para la confirmación molecular de *Salmonella* contenida en el hospedero durante la infección, se buscó la amplificación del gen *16S rRNA* (Figura 3) y del gen *invA* (Figura 4), con un tamaño de amplicón de ~402pb (pares de bases) y ~437pb respectivamente. Se consideraron positivas a *Salmonella* únicamente aquellas muestras que presentaron amplificaciones para ambos genes (55/56). Esto demuestra que a partir del día 0 hasta el día 8 posterior a la infección oral, en los ensayos de replicación, se lograron recuperar aislamientos de *S. enterica*,

provenientes de la interacción patógeno–hospedero en los ensayos con *D. melanogaster* (**Anexo IV**).

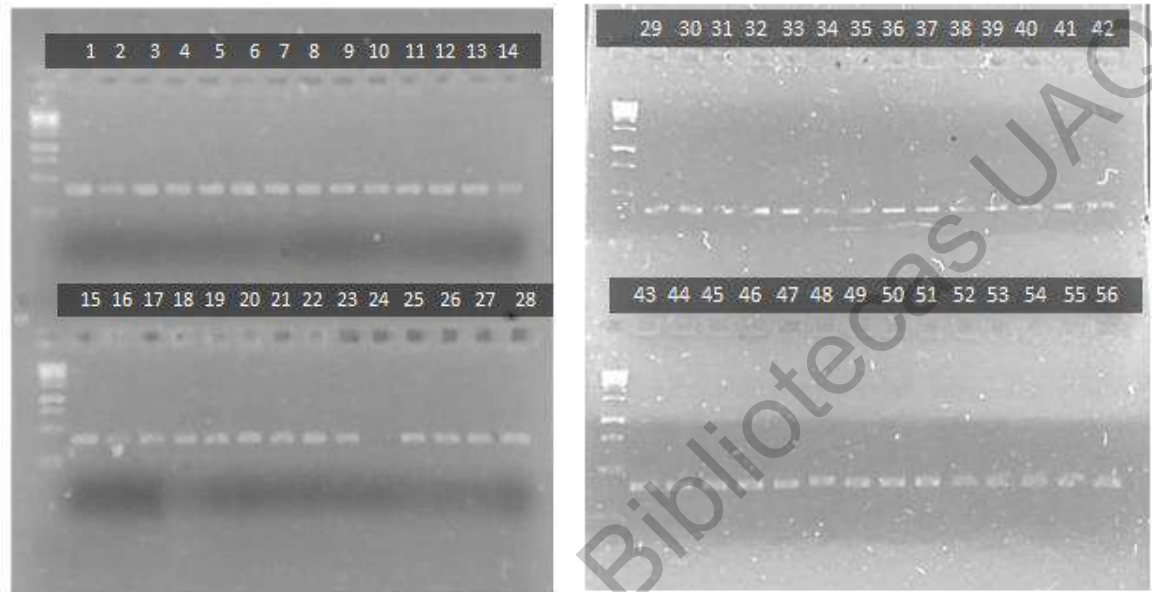


Figura 3. Gen 16S rRNA. Amplificación ~402 pb

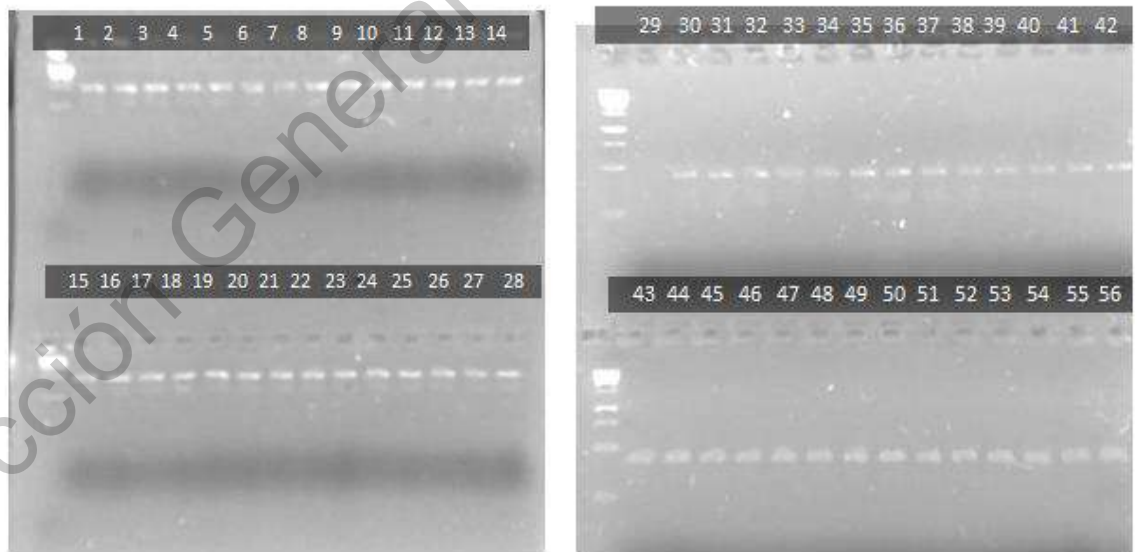
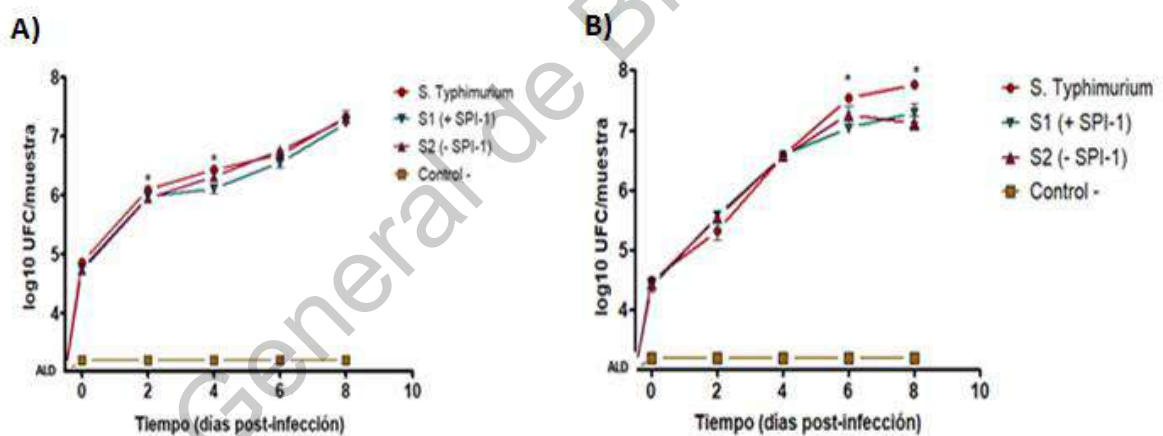


Figura 4. Gen *invA*. Amplificación ~437 pb.

6.4. Efecto de la virulencia de *S. enterica* en la enfermedad de ORR

Se diseñó un ensayo con la finalidad de evaluar el potencial de virulencia de dos cepas de *S. enterica*, serotipo Newport, recuperadas de carne de pollo en punto de venta. Estos aislamientos se caracterizan por no presentar en su genoma la SPI-2 y difieren en la presencia y ausencia de SPI-1 (**Cuadro 5**). En primera instancia, pudo observarse que la replicación de las cepas de *Salmonella* en el desafío presenta un comportamiento similar a lo largo de los 8 días de infección (**Gráfica 12**); es posible cuantificar UFC a partir del día 0 posterior a la infección oral tanto en machos ($5 \log_{10}$ UFC/muestra) como en hembras ($> 5 \log_{10}$ UFC/muestra). En machos se observa diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en los días 2 y 4 posteriores a la infección oral, alcanzando un máximo recuento de $\sim 7 \log_{10}$ UFC/muestra.



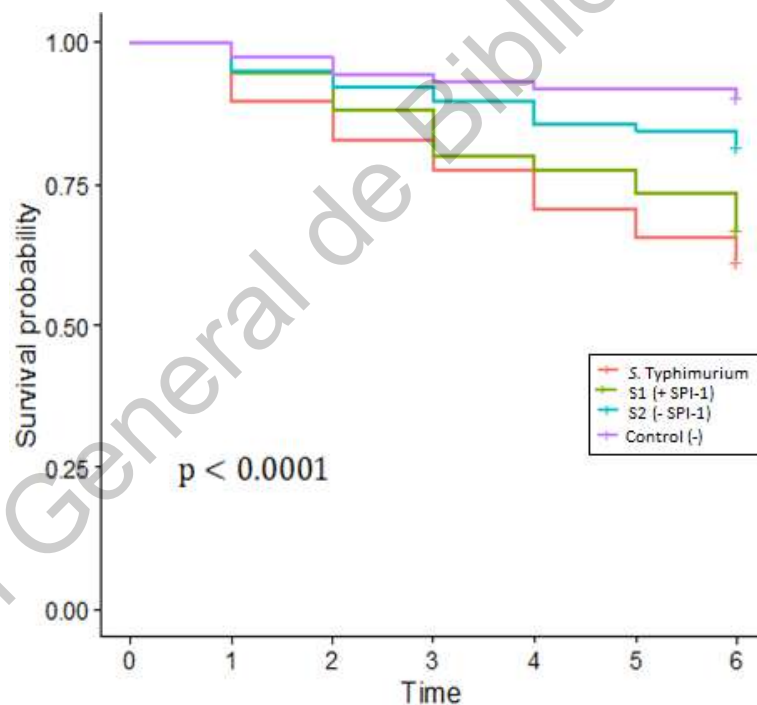
Gráfica 12. Replicación de *S. enterica* en ORR

Replicación en A) machos y B) hembras. La línea roja corresponde a *S. Typhimurium*, línea azul a S1: *S. Newport* (+ SPI-1), línea morada a S2: *S. Newport* (- SPI-1) y línea café a control negativo (sin bacterias). ALD: Abajo del Límite de Detección = 1000 células/muestra. Experimentos realizados por triplicado. *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Por otra parte, en hembras, se observa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los días 6 y 8 posterior a la infección oral, de manera que se presentan

mayores conteos para *S. Typhimurium* (8 log₁₀ UFC/muestra); en las cepas S1: *S. Newport* (+ SPI-1) y S2: *S. Newport* (- SPI-1) los conteos son < 7 log₁₀ UFC/muestra. Se presume también que la carga bacteriana de *S. Newport* (- SPI - 1) disminuye a partir del día 6 posterior a la infección oral en hembras.

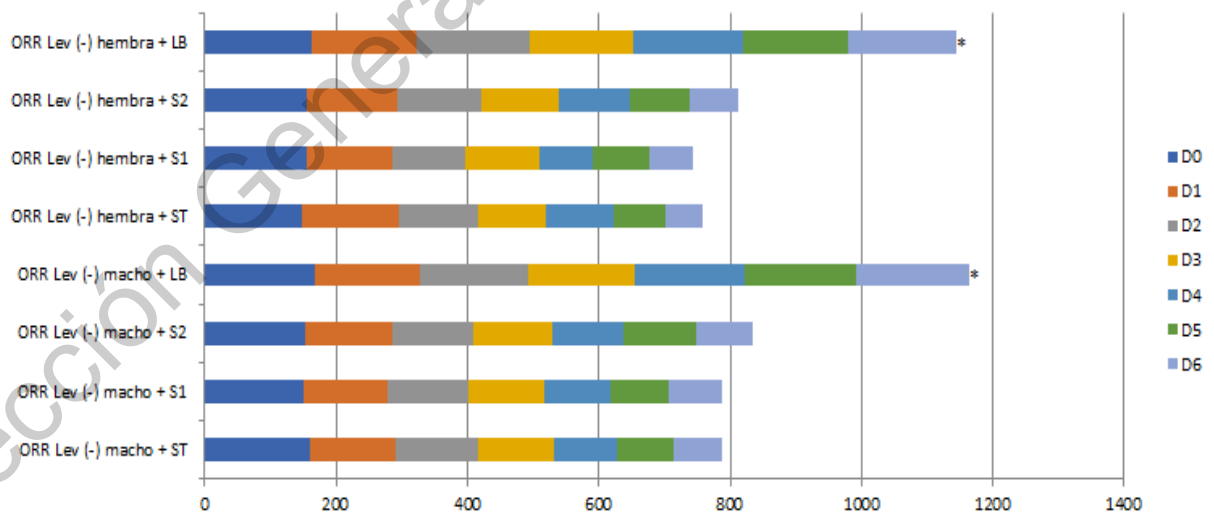
El análisis de supervivencia demuestra que existe un efecto de las cepas de *S. enterica* en la susceptibilidad de ORR ($p < 0.001$). Se observa menor supervivencia de organismos infectados con *S. Typhimurium* (~60%), seguida de los organismos infectados con *S. Newport* (+ SPI-1) (> 60%); la supervivencia de los organismos infectados por *S. Newport* (- SPI-1) fue cercana al 80% y el control negativo presentó una supervivencia cercana al 90% de la población (**Gráfica 13**).



Gráfica 13. Análisis de supervivencia en ORR

Línea rosa corresponde a *S. Typhimurium*; línea verde, S1: *S. Newport* (+ SPI-1); línea azul, S2: *S. Newport* (- SPI-1); línea morada control negativo (inóculo sin bacterias). Se observa diferencia estadística significativa entre tratamientos mediante análisis de supervivencia de Mantel-Cox ($p < 0.001$).

Para evaluar el efecto de la virulencia de *S. enterica* en la susceptibilidad de ORR, se realizó un ensayo de sobresalto con la finalidad de monitorear respuesta al estímulo por parte de los hospederos durante la enfermedad, considerados biomarcadores de susceptibilidad (**Gráfica 14**). Los resultados del análisis de sobresalto indican que hay un efecto en la respuesta de los organismos infectados con las cepas de *S. enterica* en comparación con el control ($p < 0.05$). Se observó una menor respuesta al estímulo en los organismos infectados con *S. Newport* (+ SPI-1) tanto en machos (~63%) como en hembras (~58%) respecto a los controles (> 90%), siendo las hembras quienes presentaron menor respuesta al estímulo (< 5%) en comparación con los machos. En orden ascendente en la cuantificación de la geotaxis se encuentran los organismos infectados con *S. Typhimurium* machos (65%) y hembras (~62%). Por último, los organismos infectados con la cepa *S. Newport* (- SPI-1) presentaron una mayor respuesta al estímulo siendo los machos (~69%) menos afectados que las hembras (~66%). Además, se ve reducida la respuesta al estímulo en el día 6 de la infección en los organismos infectados (> 50%) respecto al control.



Gráfica 14. Respuesta de sobresalto por día posterior a la infección oral

Se presentan ponderaciones acumuladas en la respuesta al estímulo por día para cada tratamiento. *Diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Los biomarcadores de susceptibilidad fueron evaluados en machos y hembras ORR, bajo régimen de alimentación Lev (-), en la interacción patógeno-hospedero. Estos resultados indican que en la capacidad de vuelo se observó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre machos y hembras infectadas con respecto a los controles (**Figura 5A**), siendo las hembras desafiadas con *S. Typhimurium* quienes presentaron menor respuesta a este estímulo (10%) y los machos control, los que presentaron mayor capacidad de vuelo (50%). En la capacidad de salto, se observa el mismo efecto ($p < 0.05$), donde las hembras desafiadas con *S. Typhimurium* presentaron menor respuesta al estímulo (20%) y las hembras control mayor capacidad de salto (60%) (**Figura 5B**). Respecto a la capacidad para escalar (**Figura 5C**), se observa diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre desafíos, donde los machos infectados con *S. Typhimurium* presentaron menor capacidad de escalar (10%), y mayor porcentaje de las hembras control presentaron esta condición física ($> 60\%$). En general, estas condiciones consideradas como comportamiento normal (organismos sanos) se vieron reducidas en organismos infectados, en comparación con los controles sin bacterias.

Por otra parte, las respuestas asociadas a enfermedad a parecieron después del día 1 posterior a la infección; en la condición de deterioro leve se pudo observar que existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los organismos desafiados con alguna cepa de *Salmonella* y los controles sin bacterias (**Figura 5D**), siendo los machos desafiados con *S. Newport* (-SPI-1) los que presentaron mayormente esta condición (30%). En cuanto al déficit para trepar, los machos con *S. Typhimurium* presentaron mayormente esta condición ($> 30\%$), mientras que en hembras y machos sin bacterias, no se observó esta condición física (**Figura 6A**). Respecto a la caída regular (**Figura 6B**), pudo observarse diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), donde machos infectados con *S. Typhimurium* y *S. Newport* (+ SPI-1), presentaron mayormente esta condición ($> 40\%$) respecto a

los demás tratamientos y no se observó esta respuesta en machos y hembras control.

Finalmente, en las características asociadas al estado de gravedad en general, aparecieron entre el día 2 y 5 posterior a la infección oral; no se observó diferencia estadística significativa entre los organismos infectados ($p > 0.05$), siendo las hembras infectadas con *S. Newport* (+ SPI-1) las que presentaron mayoritariamente esta condición ($> 12\%$) (**Figura 6C**). En cuanto a la etapa terminal, se observó un efecto similar a la condición anterior ($p > 0.05$), donde las hembras con *S. Newport* (+ SPI-1), presentaron mayormente esta condición ($> 12\%$) (**Figura 6D**). Estos resultados sugieren que tanto en los machos como hembras ORR de este ensayo, las cepas que provocaron más respuestas asociadas a la enfermedad son *S. Newport* (+ SPI-1) y *S. Typhimurium*.

En conjunto, los resultados de replicación de las cepas *S. enterica* en ORR, y la respuesta de sobresalto y sobrevivencia, como biomarcadores de susceptibilidad o no susceptibilidad en la interacción patógeno-hospedero (Apidianakis & Rahme, 2009), nos permitieron determinar el potencial de virulencia de las cepas recuperadas de carne de pollo empleadas en este estudio.

La cepa de *S. Typhimurium* utilizada en este ensayo, posee en su genoma a SPI-1 y SPI-2 y presentó mayores índices de replicación (8 log₁₀ UFC/muestra), y mortalidad ($> 40\%$ de la población) en el hospedero a los 6 días posteriores a la infección; comportamiento similar a lo reportado por (Brandt et al., 2004) donde se presenta el mayor índice de replicación y mortalidad en un desafío por microinyección en *D. melanogaster* con una cepa de *S. Typhimurium* con estas características. Este efecto puede atribuirse a los genes contenidos en la SPI-1, principalmente el T3SS, que son necesarios para la invasión en los enterocitos del hospedero evaluado en modelos *in vivo* (Lou et al., 2019; Zhang et al., 2019); además, los genes contenidos en la SPI-2 son indispensables para la replicación de este patógeno en la SCV, de acuerdo a estudios con modelos *in vivo* (Figueira

et al., 2013; Jennings et al., 2017). En combinación, SPI-1 y SP1-2, contribuyen a la inflamación de la mucosa, favoreciendo la patogenicidad de *S. enterica* (Hapfelmeier et al., 2005), categorizándola como altamente virulenta ya que representa una amenaza potencial de enfermedad (Andesfha et al., 2019).

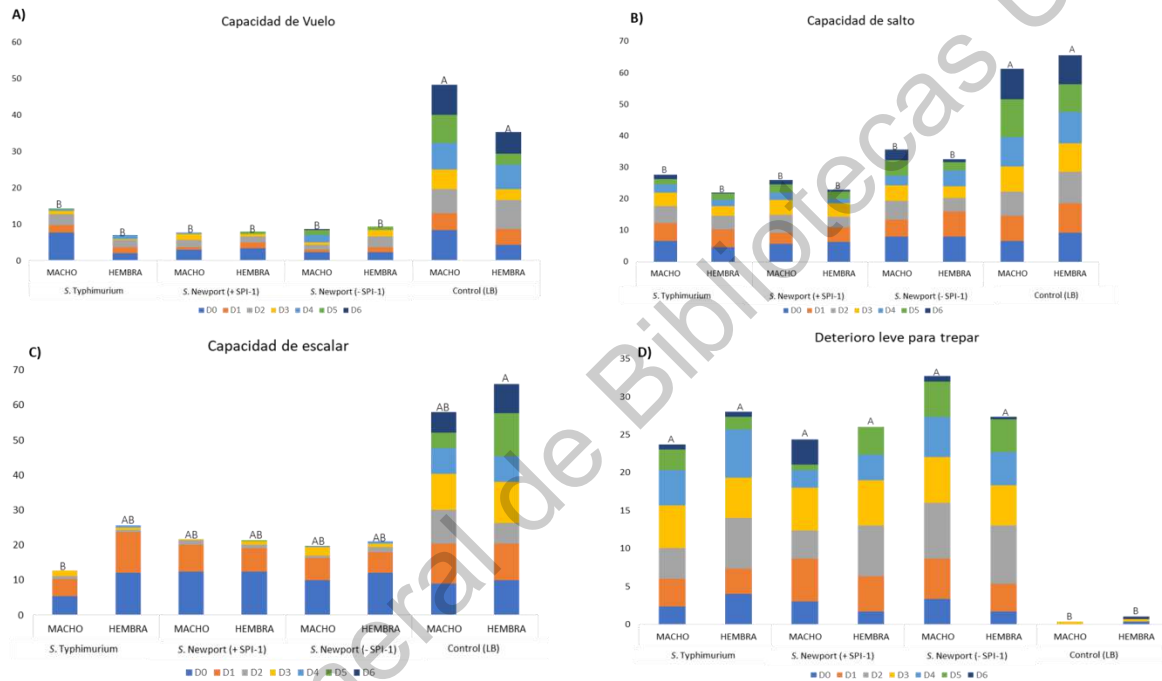


Figura 5. Respuesta de sobresalto en ORR

Ensayo realizado en machos y hembras bajo régimen de alimentación Lev (-). Condición física: A) capacidad de vuelo, B) capacidad de salto, C) capacidad para escalar, D) deterioro leve para trepar. Letras diferentes indican significancia estadística ($p < 0.05$).

La cepa S1 (+SPI-1) corresponde al serotipo Newport y en su genoma contiene la SPI-1, pero no contiene la SPI-2. Esta cepa presentó el menor índice de replicación ($< 7 \log_{10}$ UFC/muestra) pero el mayor índice de morbilidad ($> 60\%$ de la población presenta características de la enfermedad y el 30%, respuestas asociadas a estado de gravedad), resultado similar al reportado por Brandt et al.,

(2004), donde la cepa con SPI-1 (1.5×10^4 UFC/mosca) presenta menor crecimiento que *S. Typhimurium* (2×10^5 UFC/mosca) en el hospedero a los 7 días posteriores a la infección. Además, se ha reportado que SPI-1 puede contribuir a la colonización en intestino y bazo en modelos *in vivo* (Dieye et al., 2009). Los biomarcadores de susceptibilidad en la interacción patógeno-hospedero de este desafío pueden considerarse causantes de enfermedad sistémica y atribuirse a la SPI-1 ya que a través de esta isla de patogenicidad, la bacteria puede ingresar a la célula; sin embargo, una de las funciones de SPI-2 es inhibir la formación del fagolisosoma para evitar la eliminación de la bacteria, y al no estar presente la SPI-2, el patógeno puede ser procesado por las células de defensa del hospedero y de esta manera presentar menor índice de replicación e incrementar los efectos de morbilidad (Velasco-Carrillo et al., 2019; Zhang et al., 2019).

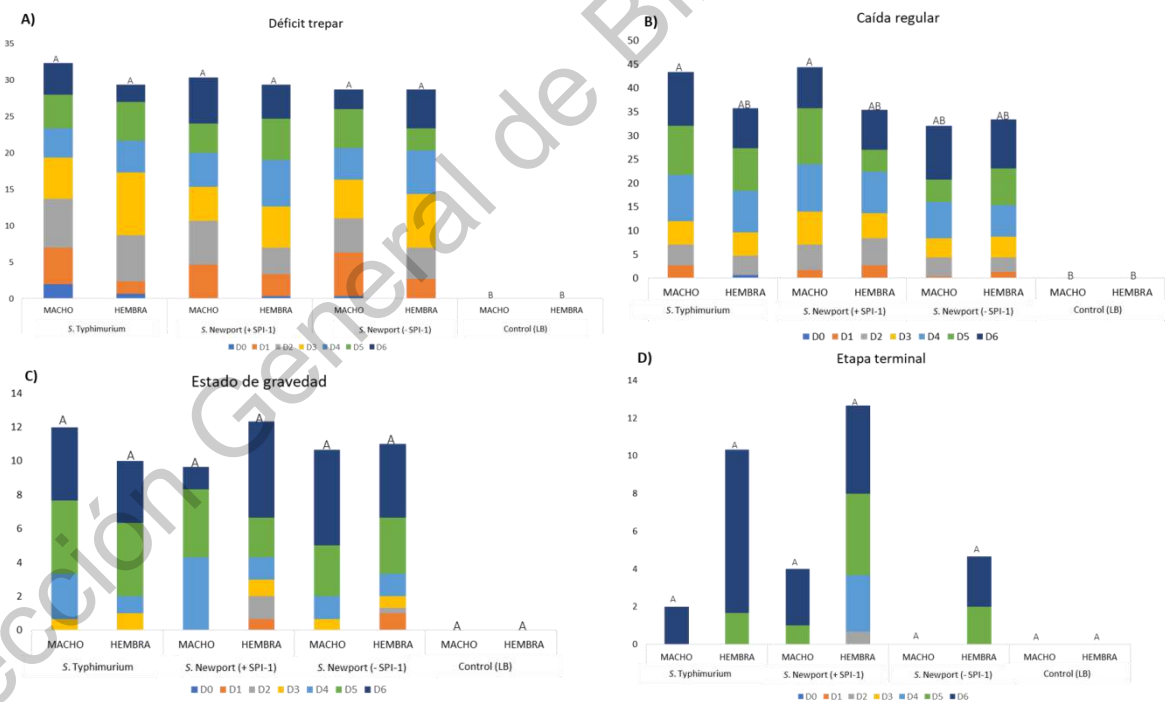


Figura 6. Respuesta de sobresalto en ORR (continuación)

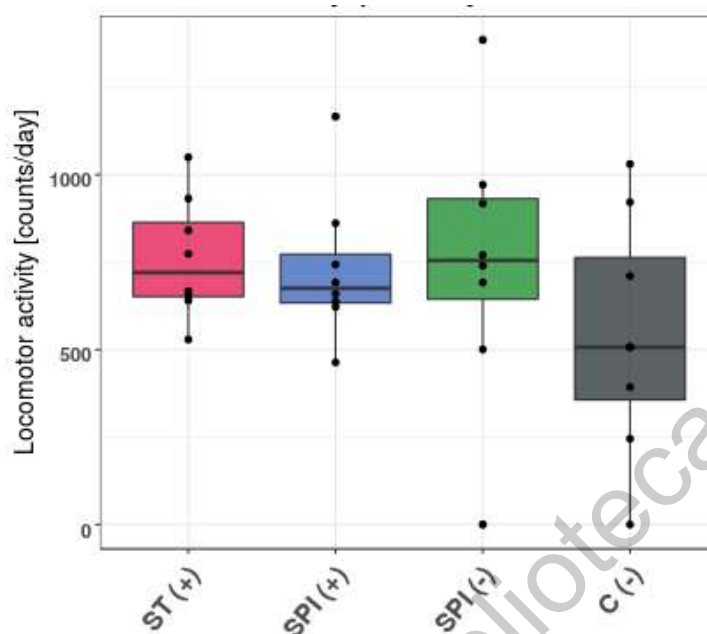
Ensayo realizado en machos y hembras bajo régimen de alimentación Lev (-). Condición física: A) Déficit para trepar, B) caída regular, C) Estado de gravedad, D) Etapa terminal. Letras diferentes indican significancia estadística ($p < 0.05$).

Por otro lado, la cepa S1 (-SPI-1) también corresponde al serotipo Newport pero en su genoma no posee SPI-1 ni SPI-2. En el desafío oral, a diferencia de las otras cepas, este aislamiento provocó la menor mortalidad (~20%) y la menor morbilidad (<60% de la población presentó características de la enfermedad y solo el 20% presentó respuestas asociadas a estado de gravedad). Estos resultados son esperados de acuerdo al estudio de (Dieye et al., 2009), donde reporta que las bacterias con mutación en SPI-1 fueron treinta veces menos invasivas que aquellas con SPI-1. Estos biomarcadores de susceptibilidad pueden sugerir que las características que presenta esta cepa, pueden causar una enfermedad entérica y no sistémica, como lo reporta (Velasco-Carrillo et al., 2019) en un estudio donde señala que las cepas con mutación en la SPI-1 y SPI-2 perdieron la capacidad de producir enfermedad sistémica en un modelo *in vivo* a los 4 días de la infección. En contraste con estos resultados, estudios recientes han demostrado que *S. enterica* tiene la capacidad de causar enfermedad entérica de una manera independiente a SPI-1 en modelos de infección *in vivo* (Hapfelmeier et al., 2005; Howe et al., 2017). Estos resultados sugieren que la infección no depende únicamente de SPI-1 y SPI-2 (Morrison et al., 2012) y que *S. enterica* puede utilizar vías alternas, como CD18 o adhesinas codificadas por la SPI-4, para favorecer su ingreso a la célula (Pham & McSorley, 2015; Mambu et al., 2017).

6.5 Ensayo de conducta como biomarcador de susceptibilidad en *D. melanogaster* ante la infección con *S. enterica*

El método de geotaxis puede presentar ventajas como sensibilidad y la posibilidad de probar una gran cantidad de organismos al mismo tiempo; sin embargo, al considerar que en este protocolo puede presentarse el error humano (Woods, 2014), se decidió realizar un ensayo de actividad locomotora en hembras ORR bajo régimen de alimentación Lev (-), como prueba complementaria en la descripción del ensayo de sobresalto. En los resultados preliminares de actividad locomotora (**Gráfica 15**) puede observarse que los organismos infectados con *S.*

Typhimurium presentan una actividad locomotora superior a 760 conteos/día; los organismos desafiados con *S. Newport* (+SPI-1), >730 conteos/día; las moscas infectadas con *S. Newport* (-SPI-1), más de 850 conteos/día; mientras que los organismos que consumieron inóculo sin bacterias presentan < 620 conteos por día. A pesar de que no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$), se observa que los organismos infectados con alguna cepa de *S. enterica* presentaron una media superior de conteos por día en la actividad locomotora en comparación con el control (inóculo sin bacterias) (< 150 conteos/día que en moscas infectadas). Además, los organismos control presentaron una mayor dispersión en su actividad locomotora. Estos resultados contrastan con lo reportado por (Vale & Jardine, 2015), quien reporta que en el ensayo de actividad locomotora en moscas infectadas, el efecto observado es letargia. Un efecto similar es reportado por (Schretter et al., 2018) en hembras ORR después de 2 días de evaluar el comportamiento, donde las moscas infectadas con enterobacterias presentan conteos de actividad locomotora entre 100 y 400; por otro lado, en moscas no infectadas estos conteos varían entre 200 y 300; sin embargo, no se presentan significancias entre estos tratamientos. Esto puede explicarse debido a que la actividad locomotora espontánea de la mosca, está influenciada por factores como edad, sexo y la condición fisiológica en la que se encuentren los organismos (Woods et al., 2014); por ejemplo, en moscas enfermas se han reportado movimientos constantes, perdiendo la regulación de locomoción (0% rítmicas) (Shirasu-Hiza et al., 2007).



Gráfica 15. Gráfica de actividad locomotora

Conteos de actividad locomotora por día. Caja rosa: ST (*S. Typhimurium*), control positivo; caja azul: S1: *S. Newport* (+SPI-1); caja verde S2: *S. Newport* (-SPI-1); caja gris (sin bacterias), control negativo. No se observa diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

Este ensayo también permitió evaluar el perfil de actividad y sueño por día (**Figura 7**). En el perfil de actividad por día no se observan diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre el comportamiento de las moscas infectadas y el control (inóculo sin bacterias). Por otro lado, en el perfil de sueño, definido por cinco minutos contiguos de inactividad física (Chiu et al., 2010), se presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos, siendo las moscas control quienes presentaron mayores perfiles de sueño; resultado esperado de acuerdo a Shirasu-Hiza et al., (2007) donde señala que las moscas infectadas presentan sesiones cortas de sueño, en comparación con las moscas sanas.

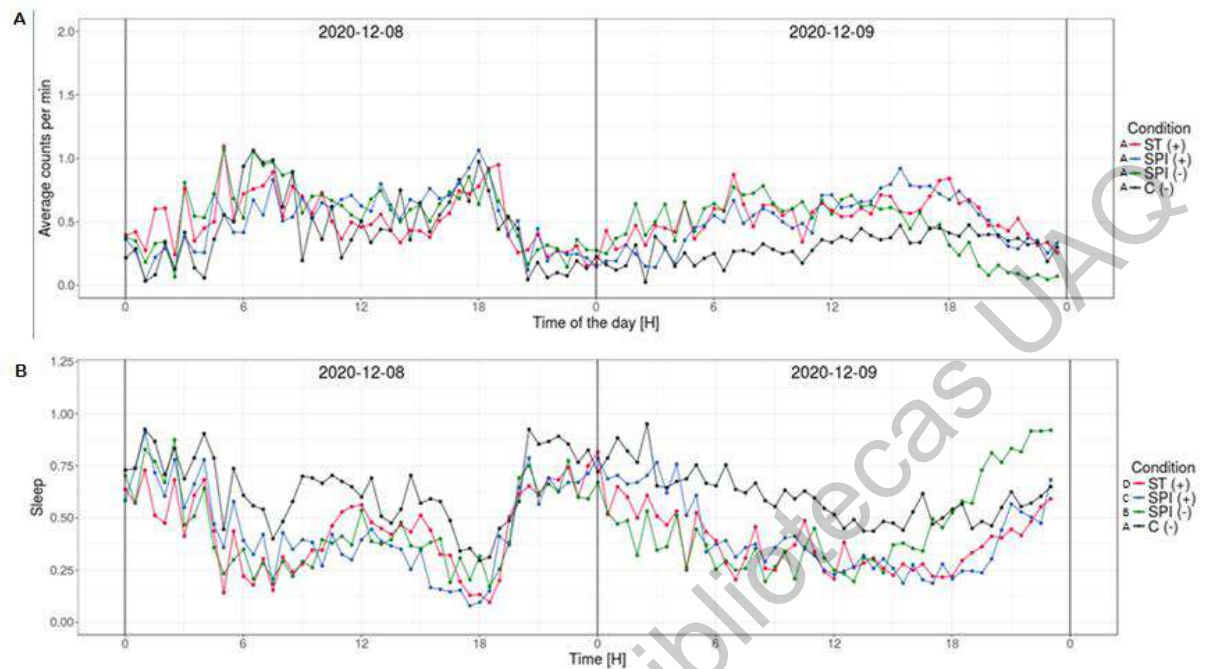


Figura 7. Perfil de actividad y sueño

Distribución de actividad durante el día (A) y Perfil de sueño por día (B). Línea rosa corresponde a organismos infectados con *S. Typhimurium*; Línea azul, organismos infectados con S1: *S. Newport* (+ SPI-1); línea verde, S2: *S. Newport* (- SPI-1) y línea gris, organismos con inóculo sin bacterias. Letras diferentes para cada línea indican significancia estadística ($p < 0.05$).

Finalmente, estos resultados preliminares pueden relacionarse con el ensayo de sobresalto, donde los organismos desafiados con *S. Typhimurium* son los que presentaron mayores índices de morbilidad; mientras que los desafiados con la cepa *S. Newport* (- SPI-1) son los que presentaron los menos índices de este comportamiento. Estos resultados, junto con el desajuste en el perfil de sueño, pueden sugerir que la ritmicidad de los ciclos circadianos puede suprimirse, atenuarse o alterarse durante la infección en *D. melanogaster* como lo sugiere (Bellet et al., 2013) en modelos *in vivo*.

Evaluar el perfil de actividad locomotora en los organismos que son infectados con *S. enterica*, para contribuir en la caracterización de la virulencia de dichos aislamientos es de suma importancia ya que se ha reportado que la regulación circadiana puede influir en la activación de la respuesta inmunitaria para combatir la infección (Lee & Edery, 2008). Los resultados de este ensayo se consideran preliminares, por lo que se encuentran pendientes de comprobación para poder robustecer la prueba para de esta forma implementarlo como complemento en los biomarcadores de susceptibilidad que el sistema modelo *D. melanogaster* ofrece para estudiar los aislamientos de *S. enterica* recuperados de matrices cárnicas.

7. CONCLUSIONES

El presente trabajo revela que *D. melanogaster* puede ser utilizado como un organismo modelo para evaluar el efecto de la infección oral con cepas de *S. enterica*. En general se observó que las dietas suplementadas o no suplementadas con levadura no tienen efecto en el consumo del inóculo; además; se observó que estos regímenes alimenticios no influyen en la supervivencia de los organismos ante la infección.

Asimismo, en el presente trabajo se observó que la dieta sin levadura previa a la infección de los organismos permitió mayor replicación de *Salmonella* en el hospedero y que las hembras son más susceptibles a la infección, en términos de morbilidad y mortalidad comparando con los machos.

Interesantemente se observó que *D. melanogaster* presentó distintos biomarcadores de susceptibilidad cuando fue desafiada con cepas de *S. enterica* con diferencias en el perfil genético de virulencia en cuanto a las SPI-1 y SPI-2. De igual forma, se observaron cambios en la actividad locomotora y perfil de sueño (resultados preliminares). Esto sugiere que el sistema modelo propuesto en el presente estudio, como herramienta permite evaluar la virulencia de las cepas de *S. enterica*, y a su vez permite categorizar los aislamientos recuperados de matrices alimentarias.

8. PERSPECTIVA

Este trabajo sugiere que no todas las cepas de *S. enterica* recuperadas de carne de pollo u otras matrices cárnicas, tienen impacto en la salud del consumidor, estado de enfermedad o gravedad que estas provoquen en el hospedero. Por esta razón, resulta necesario continuar con el rastreo de *Salmonella* y realizar ensayos de tamizaje, mediante herramientas como la que se propone en este trabajo, con la finalidad de categorizar las cepas que son capaces de causar daño y las que no y el nivel de riesgo que impliquen. De esta manera, complementar su caracterización como cepas con alto potencial de virulencia e identificar marcadores o características que puedan ser detectadas mediante técnicas cultivo dependientes o técnicas moleculares.

Asimismo, es necesario continuar con los ensayos de interacción patógeno-hospedero, desafiando distintas cepas, con diversos repertorios genéticos, o características de virulencia o multirresistencia y correlacionar con los biomarcadores de susceptibilidad, cambios en la conducta, o en la respuesta inmunitaria del hospedero.

Al conocer cada vez más las características de los aislamientos de *S. enterica* más prevalentes en matrices cárnicas y otros alimentos, a través del sistema modelo *D. melanogaster*, se podrán establecer más y mejores medidas de control de *S. enterica*.

9. REFERENCIAS

- Adley, C. C., & Ryan, M. P. (2016). The nature and extent of foodborne disease. En *Antimicrobial Food Packaging* (pp. 1-10). University of Limerick. Elsevier Inc. Ireland <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2>
- Anderson, C. J., Clark, D. E., Adli, M., & Kendall, M. M. (2015). Ethanolamine signaling promotes *Salmonella* niche recognition and adaptation during Infection. Andreas J Baumbler, University of California, Davis School of Medicine, *PLOS Pathogens*. 11(11), United States. e1005278. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005278>
- Andesfha, E., Indrawati, A., Mayasari, N., Rahayuningtyas, I., & Jusa, I. (2019). Detection of *Salmonella* pathogenicity island and *Salmonella* plasmid virulence genes in *Salmonella* Enteritidis originated from layer and broiler farms in Java Island. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 384. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f358>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110-121. Porto, Portugal. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Apidianakis, Y., & Rahme, L. G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. Publishing group. *Nature Protocols*, 4(9), 1285-1294. USA. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.124>

- Balbuena-Alonso, M. G. (2019). Repertorios genéticos de virulencia y multirresistencia a antibióticos de *Salmonella enterica* prevalente en carne de pollo [Tesis]. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Banerji, S., Simon, S., Tille, A., Fruth, A., & Flieger, A. (2020). Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Scientific Reports*, 10(1), 4333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61254-1>
- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). *Salmonella enterica*: Una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de infectología*, 33(5), 547-557. Chile. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000500010>
- Bellet, M. M., Deriu, E., Liu, J. Z., Grimaldi, B., Blaschitz, C., Zeller, M., Edwards, R. A., Sahar, S., Dandekar, S., Baldi, P., George, M. D., Raffatellu, M., & Sassone-Corsi, P. (2013). Circadian clock regulates the host response to *Salmonella*. Edited by Joseph S. Takahashi, Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9897-9902. Texas. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120636110>
- Belmonte, R. L., Corbally, M.-K., Duneau, D. F., & Regan, J. C. (2020). Sexual dimorphisms in innate immunity and responses to infection in *Drosophila melanogaster*. Susanna Valanne, Tampere University, Finland *Frontiers in Immunology*, 10, 3075. Finland <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03075>

- Bernal-Bayard, J., & Ramos-Morales, F. (2018). Molecular mechanisms used by *Salmonella* to evade the immune system. *Current Issues in Molecular Biology*, 133-168. <https://doi.org/10.21775/cimb.025.133>
- Bloomington *Drosophila* Stock Center. Obtenido de Universidad de Indiana Bloomington. (2017). <https://bdsc.indiana.edu/index.html>
- Brandt, S. M., Dionne, M. S., Khush, R. S., Pham, L. N., Vigdal, T. J., & Schneider, D. S. (2004). Secreted bacterial effectors and host-produced eiger/TNF drive death in a *Salmonella*-infected fruit fly. *PLoS Biology*, 2(12), e418. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020418>
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465-2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell Proliferation. *Cell Host & Microbe*, 5(2), 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*—from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14(12), 796-810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>

- Cabral, J. P. S. (2010). Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10), 3657-3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>
- Capo, F., Charroux, B., & Royet, J. (2016). Bacteria sensing mechanisms in *Drosophila* gut: local and systemic consequences. *Developmental & Comparative Immunology*, 64, 11-21. France. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.001>
- Castonguay-Vanier, J., Vial, L., Tremblay, J., & Déziel, E. (2010). *Drosophila melanogaster* as a model host for the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS ONE*, 5(7), e11467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011467>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>
- Chambers, M. C., Lightfield, K. L., & Schneider, D. S. (2012). How the Fly Balances Its Ability to Combat Different Pathogens. *PLoS Pathogens*, 8(12), e1002970. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002970>
- Chen, Y., Liu, H., Chen, M., Sun, H.-Y., & Wu, Y.-N. (2020). The human health burden of non-typhoidal *Salmonella enterica* and *Vibrio parahaemolyticus* foodborne gastroenteritis in Shanghai, east China. *PLOS ONE*, 15(11), e0242156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242156>
- Chen, Z., Bai, J., Wang, S., Zhang, X., Zhan, Z., Shen, H., Zhang, H., Wen, J., Gao, Y., Liao, M., & Zhang, J. (2020). Prevalence, antimicrobial resistance,

virulence genes and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail duck meat in Southern China. *Microorganisms*, 8(3), 444.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030444>

Chiu, J. C., Low, K. H., Pike, D. H., Yildirim, E., & Edery, I. (2010). Assaying locomotor activity to study circadian rhythms and sleep parameters in *Drosophila*. *Journal of Visualized Experiments*, 43, 2157.
<https://doi.org/10.3791/2157>

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Rodríguez, M. H., Alvarado-Delgado, A., & Lanz-Mendoza, H. (2014). Cost of immune priming within generations: Trade-off between infection and reproduction. *Microbes and Infection*, 16(3), 261-267. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.010>

Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P., & Cormican, M. (2014). Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from Food Contact Surface Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1507-1514.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03109-13>

Cosby, D. E., Cox, N. A., Harrison, M. A., Wilson, J. L., Buhr, R. J., & Fedorka-Cray, P. J. (2015). *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 24(3), 408-426.
<https://doi.org/10.3382/japr/pfv038>

- Cox, N. A., Cason, J. A., & Richardson, L. J. (2011). Minimization of *Salmonella* contamination on raw poultry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2(1), 75-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133715>
- CSHP, C. S. H. L. P. (2014). *Fly Food Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratories Press. California. doi:10.1101/pdb.rec081414
- DataBase of Drosophila & Genes & Genomes*. (2019). Natural Human Genome Research Institute. U. S National Institutes of Health. USA. <http://www.flybase.net/>
- Deng, W., Quan, Y., Yang, S., Guo, L., Zhang, X., Liu, S., Chen, S., Zhou, K., He, L., Li, B., Gu, Y., Zhao, S., & Zou, L. (2018). Antibiotic resistance in *Salmonella* from retail foods of animal origin and its association with disinfectant and heavy metal resistance. *Microbial Drug Resistance*, 24(6), 782-791. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0127>
- Díaz-Peña, L. F., García-Arredondo, A., & Riesgo-Escovar, J. R. (2019). *Drosophila* bioassays are very sensitive methods to assess tarantula species venoms. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 96, 56-60. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.01.003>
- Dieye, Y., Ameiss, K., Mellata, M., & Curtiss, R. (2009). The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization

of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiology*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-3>

Dionne, M. S., & Schneider, D. S. (2008). Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Disease Models & Mechanisms*, 1(1), 43-49. <https://doi.org/10.1242/dmm.000307>

Dos Santos, A. M. P., Ferrari, R. G., & Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76(6), 762-773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>

Elbi, S., T.R., N., V.K., R., Baranwal, G., Biswas, R., R., J., & S., S. (2017). Fucoidan coated ciprofloxacin loaded chitosan nanoparticles for the treatment of intracellular and biofilm infections of *Salmonella*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.003>

Eleftherianos, I., More, K., Spivack, S., Paulin, E., Khojandi, A., & Shukla, S. (2014). Nitric oxide levels regulate the immune response of *Drosophila melanogaster* reference laboratory strains to bacterial infections. *Infection and Immunity*, 82(10), 4169-4181. <https://doi.org/10.1128/IAI.02318-14>

Ellis, M. J., Tsai, C. N., Johnson, J. W., French, S., Elhenawy, W., Porwollik, S., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., Magolan, J., Coombes, B. K., & Brown, E. D. (2019). A macrophage-based screen identifies antibacterial

compounds selective for intracellular *Salmonella* Typhimurium. *Nature Communications*, 10(1), 197. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08190-x>

Esquivel-Hernández, Y. (2019). Diversidad y distribución de *Salmonella enterica* en productos cárnicos avícolas. Universidad Autónoma de Querétaro.

Ferreira, Á. G., Naylor, H., Esteves, S. S., Pais, I. S., Martins, N. E., & Teixeira, L. (2014). The Toll-dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004507>

Figueira, R., & Holden, D. W. (2012). Functions of the *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. *Microbiology*, 158(5), 1147-1161. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058115-0>

Figueira, R., Watson, K. G., Holden, D. W., & Helaine, S. (2013). Identification of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* Serovar Typhimurium: implications for rational vaccine Design. *MBio*, 4(2), e00065-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00065-13>

Flystock. (2019). *Cold Spring Harbor Protocols*. Indiana University. doi:10.1101/pdb.rec081414

Ford, L., Moffatt, C. R. M., Fearnley, E., Miller, M., Gregory, J., Sloan-Gardner, T. S., Polkinghorne, B. G., Bell, R., Franklin, N., Williamson, D. A., Glass, K., & Kirk, M. D. (2018). The epidemiology of *Salmonella enterica* outbreaks in

Australia, 2001–2016. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 86.
<https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00086>

Forest, C. G., Ferraro, E., Sabbagh, S. C., & Daigle, F. (2010). Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. *Microbiology*, 156(12), 3689-3698. <https://doi.org/10.1099/mic.0.041624-0>

Gaitanidis, A., Dimitriadou, A., Dowse, H., Sanyal, S., Duch, C., & Consoulas, C. (2019). Longitudinal assessment of health-span and pre-death morbidity in wild type *Drosophila*. *Aging*, 11(6), 1850-1873.
<https://doi.org/10.18632/aging.101880>

Gharieb, R. M., Tartor, Y. H., & Khedr, M. H. E. (2015). Non-Typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: Prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains. *Gut Pathogens*, 7(1), 34.
<https://doi.org/10.1186/s13099-015-0081-1>

Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). *Salmonella enterica* in Mexico 2000–2017: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Prevalence in Food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 98-118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>

Gou, B., Zhu, E., He, R., Stern, U., & Yang, C.-H. (2016). High throughput assay to examine egg-laying preferences of Individual *Drosophila melanogaster*.

Journal of Visualized Experiments, 109, 53716.

<https://doi.org/10.3791/53716>

Grangeteau, C., Yahou, F., Everaerts, C., Dupont, S., Farine, J.-P., Beney, L., & Ferveur, J.-F. (2018). Yeast quality in juvenile diet affects *Drosophila melanogaster* adult life traits. *Scientific Reports*, 8(1), 13070.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31561-9>

Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2018). *Salmonella* infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: A review.

Microbiology, 164(11), 1327-1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>

Hapfelmeier, S., Stecher, B., Barthel, M., Kremer, M., Müller, A. J., Heikenwalder, M., Stallmach, T., Hensel, M., Pfeffer, K., Akira, S., & Hardt, W.-D. (2005). The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-2 and SPI-1 Type III Secretion Systems allow *Salmonella* Serovar *Typhimurium* to trigger colitis via MyD88-dependent and MyD88-independent mechanisms.

The Journal of Immunology, 174(3), 1675-1685.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1675>

Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). *Salmonella* interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53-66.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1788>

- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>
- Hernández R., J. B., & Kim Y., P. (2021). *Epidemiology morbidity and mortality*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547668/>
- Hoang, D., Kopp, A., & Chandler, J. A. (2015). Interactions between *Drosophila* and its natural yeast symbionts—is *Saccharomyces cerevisiae* a good model for studying the fly-yeast relationship? *PeerJ*, 3, e1116. <https://doi.org/10.7717/peerj.1116>
- Hori, A., Kurata, S., & Kuraishi, T. (2018). Unexpected role of the IMD pathway in *Drosophila* gut defense against *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 395-400. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.004>
- Howe, K., Salehi, S., Hartford Bailey, R., Brooks, J. P., Wills, R., Lawrence, M. L., & Karsi, A. (2017). Supplemental invasion of *Salmonella* from the perspective of *Salmonella enterica* serovars Kentucky and Typhimurium. *BMC Microbiology*, 17(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0989-3>
- Howick, V. M., & Lazzaro, B. P. (2014). Genotype and diet shape resistance and tolerance across distinct phases of bacterial infection. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-56>

- Huang, T., Jiang, C., Yang, M., Xiao, H., Huang, X., Wu, L., & Yao, M. (2020). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium inhibits the innate immune response and promotes apoptosis in a ribosomal/TRP53-dependent manner in swine neutrophils. *Veterinary Research*, 51(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00828-3>
- Hume, P. J., Singh, V., Davidson, A. C., & Koronakis, V. (2017). Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 348. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00348>
- Huneau-Salaün, A., Stärk, K. D. C., Mateus, A., Lupo, C., Lindberg, A., & Le Bouquin-Leneveu, S. (2015). Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiology and Infection*, 143(11), 2459-2472. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003379>
- Igboin, C. O., Griffen, A. L., & Leys, E. J. (2012). The *Drosophila melanogaster* host model. *Journal of Oral Microbiology*, 4(1), 10368. <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10368>
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504-521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

- Jennings, E., Thurston, T. L. M., & Holden, D. W. (2017). *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host & Microbe*, 22(2), 217-231. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.009>
- Joseph, R. M., Devineni, A. V., King, I. F. G., & Heberlein, U. (2009). Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(27), 11352-11357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901419106>
- Kang, E., Crouse, A., Chevallier, L., Pontier, S. M., Alzahrani, A., Silué, N., Campbell-Valois, F.-X., Montagutelli, X., Gruenheid, S., & Malo, D. (2018). Enterobacteria and host resistance to infection. *Mammalian Genome*, 29(7-8), 558-576. <https://doi.org/10.1007/s00335-018-9749-4>
- Kang, M. S., Oh, J.-Y., Kwon, Y.-K., Lee, D.-Y., Jeong, O.-M., Choi, B.-K., Youn, S.-Y., Jeon, B.-W., Lee, H.-J., & Lee, H.-S. (2017). Public health significance of major genotypes of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis present in both human and chicken isolates in Korea. *Research in Veterinary Science*, 112, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.02.010>
- Ke, Y., Lu, W., Liu, W., Zhu, P., Chen, Q., & Zhu, Z. (2020). Non-typhoidal *Salmonella* infections among children in a tertiary hospital in Ningbo, Zhejiang, China, 2012–2019. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(10), e0008732. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008732>

- Keesey, I. W., Koerte, S., Khallaf, M. A., Retzke, T., Guillou, A., Grosse-Wilde, E., Buchon, N., Knaden, M., & Hansson, B. S. (2017). Pathogenic bacteria enhance dispersal through alteration of *Drosophila* social communication. *Nature Communications*, 8(1), 265. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00334-9>
- Kenmoku, H., Hori, A., Kuraishi, T., & Kurata, S. (2017). A novel mode of induction of the humoral innate immune response in *Drosophila* larvae. *Disease Models & Mechanisms*, 10(3), 271-281. <https://doi.org/10.1242/dmm.027102>
- Khalil, S., Jacobson, E., Chambers, M. C., & Lazzaro, B. P. (2015). Systemic Bacterial Infection and Immune Defense Phenotypes in *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, 99, 52613. <https://doi.org/10.3791/52613>
- Khamesipour, F., Lankarani, K. B., Honarvar, B., & Kwenti, T. E. (2018). A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health*, 18(1), 1049. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5934-3>
- Khan, A. S., Georges, K., Rahaman, S., Abdela, W., & Adesiyun, A. A. (2018). Prevalence and serotypes of *Salmonella* spp. on chickens sold at retail outlets in Trinidad. *PLOS ONE*, 13(8), e0202108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202108>

- Knuff, K., & Finlay, B. B. (2017). What the SIF Is Happening—The role of intracellular *Salmonella*-induced filaments. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 335. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00335>
- Kunwar, R., Singh, H., Mangla, V., & Hiremath, R. (2013). Outbreak investigation: *Salmonella* food poisoning. *Medical Journal Armed Forces India*, 69(4), 388-391. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2013.01.005>
- Kutzer, M. A. M., Kurtz, J., & Armitage, S. A. O. (2019). A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. *Journal of Animal Ecology*, 88(4), 566-578. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953>
- Lebreton, S., Witzgall, P., Olsson, M., & Becher, P. G. (2014). Dietary glucose regulates yeast consumption in adult *Drosophila* males. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00504>
- Lee, J.-E., & Edery, I. (2008). Circadian Regulation in the Ability of *Drosophila* to Combat Pathogenic Infections. *Current Biology*, 18(3), 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.054>
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264-276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>

- Lee, Y.-J., Jang, H.-J., Chung, I.-Y., & Cho, Y.-H. (2018). *Drosophila melanogaster* as a polymicrobial infection model for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology*, 56(8), 534-541. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8331-9>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Litvak, Y., Mon, K. K. Z., Nguyen, H., Chanthavixay, G., Liou, M., Velazquez, E. M., Kutter, L., Alcantara, M. A., Byndloss, M. X., Tiffany, C. R., Walker, G. T., Faber, F., Zhu, Y., Bronner, D. N., Byndloss, A. J., Tsolis, R. M., Zhou, H., & Bäumlner, A. J. (2019). Commensal Enterobacteriaceae protect against *Salmonella* colonization through oxygen competition. *Cell Host & Microbe*, 25(1), 128-139.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.003>
- Liu, H., Whitehouse, C. A., & Li, B. (2018). Presence and eersistence of *Salmonella* in water: The impact on microbial quality of water and food safety. *Frontiers in Public Health*, 6, 159. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00159>
- Liu, W., Zhang, K., Li, Y., Su, W., Hu, K., & Jin, S. (2017). Enterococci mediate the oviposition preference of *Drosophila melanogaster* through sucrose catabolism. *Scientific Reports*, 7(1), 13420. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13705-5>

- Lou, L., Zhang, P., Piao, R., & Wang, Y. (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and its complex regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of Nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882-889. <https://doi.org/10.1086/650733>
- Mambu, J., Virlogeux-Payant, I., Holbert, S., Grépinet, O., Velge, P., & Wiedemann, A. (2017). An updated view on the Rck invasin of *Salmonella*: still much to discover. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 500. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00500>
- Markow, T. A. (2015). The secret lives of *Drosophila* flies. *ELife*, 4, e06793. <https://doi.org/10.7554/eLife.06793>
- Martins, M., Hurley, D., McCusker, M. P., & Fanning, S. (2014). *Salmonella*–host interactions – modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Massey, J. H. (2019). The *yellow* gene influences *Drosophila* male mating success through sex comb melanization. 33. USA. Doi: <https://doi.org/10.1101/673756>
- Menon, A., Varma, V., & Sharma, V. K. (2014). Rhythmic egg-laying behaviour in virgin females of fruit flies *Drosophila melanogaster*. *Chronobiology*

International, 31(3), 433-441.

<https://doi.org/10.3109/07420528.2013.866131>

Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Blanc, H., Lambrechts, L., & Saleh, M.-C. (2018). Immune priming and clearance of orally acquired RNA viruses in *Drosophila*. *Nature Microbiology*, 3(12), 1394-1403.

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0265-9>

Morrison, C. M., Dial, S. M., Day, W. A., & Joens, L. A. (2012). Investigations of *Salmonella enterica* Serovar Newport infections of oysters by using immunohistochemistry and Knockout mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2867-2873.

<https://doi.org/10.1128/AEM.07456-11>

Möst, T. (2014). *Salmonella* virulence factors and their role in intracellular parasitism. AIX-MARSEILLE UNIVERSITE. Francia.

Mthembu, Zishiri, & Zowalaty. (2019). Detection and molecular identification of *Salmonella* virulence genes in Livestock Production Systems in South Africa. *Pathogens*, 8(3), 124. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030124>

NARMS. (2017). *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*. <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/2015-narms-integrated-report>

National Institutes of Health. (2019). Maryland. U.S. Department of Health and Human Services. <https://medlineplus.gov/salmonellainfections.html>

- Nehme, N. T., Ewbank, J. J., & Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), 16.
- Nehme, N. T., Liégeois, S., Kele, B., Giammarinaro, P., Pradel, E., Hoffmann, J. A., Ewbank, J. J., & Ferrandon, D. (2007). A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*, 3(11), e173. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030173>
- Nidaullah, H., Abirami, N., Shamila-Syuhada, A. K., Chuah, L.-O., Nurul, H., Tan, T. P., Zainal Abidin, F. W., & Rusul, G. (2017). Prevalence of *Salmonella* in poultry processing environments in wet markets in penang and perlis, Malaysia. *Veterinary World*, 10(3), 286-292. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.286-292>
- Nuccio, S.-P., & Bäumler, A. J. (2014). Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *MBio*, 5(2), e00929-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.00929-14>
- Ochoa, I. M. F., & Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev Latinoam Microbiol*, 19. Asociación Mexicana de Microbiología, A.C.
- Organización Mundial de la Salud. (2019). Temas de salud. Salmonelosis. <https://www.who.int/topics/salmonella/es/>

- Padilla, Y. J. (2016). *Effects of gut-associated yeasts on Drosophila melanogaster performance*. 93. Western University. Electronic thesis and dissertation Repository. 4285. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/4285>.
- Palmer, A. D., & Slauch, J. M. (2017). Mechanisms of *Salmonella* pathogenesis in animal models. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 23(8), 1877-1892. <https://doi.org/10.1080/10807039.2017.1353903>
- NPG (2006) Pathogenesis: Of host and pathogen (Nat Immunol 7, 217). *Nature immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni0306-217>
- Pava-Ripoll, M., Pearson, R. E. G., Miller, A. K., Tall, B. D., Keys, C. E., & Ziobro, G. C. (2015). Ingested *Salmonella enterica*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*: Transmission dynamics from adult house flies to their eggs and first filial (F1) generation adults. *BMC Microbiology*, 15(1), 150. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0478-5>
- Pava-Ripoll, M., Pearson, R. E. G., Miller, A. K., & Ziobro, G. C. (2012). Prevalence and Relative Risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7891-7902. <https://doi.org/10.1128/AEM.02195-12>

- Pham, O. H., & McSorley, S. J. (2015). Protective host immune responses to *Salmonella* infection. *Future Microbiology*, 10(1), 101-110. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.98>
- Rayl, R. J., & Wratten, S. D. (2016). A comparison of anesthesia techniques for entomological experimentation: Longevity of the leaf-mining fly pest *Scaptomyza flava* Fallén (*Drosophilidae*) [Preprint]. PeerJ Preprints. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.2571v1>
- Regalado-Pineda, I. D., Rodarte-Medina, R., Resendiz-Nava, C. N., Saenz-Garcia, C. E., Castañeda-Serrano, P., & Nava, G. M. (2020). Three-Year longitudinal study: prevalence of *Salmonella enterica* in chicken meat is higher in supermarkets than wet markets from Mexico. *Foods*, 9(3), 264. <https://doi.org/10.3390/foods9030264>
- Reid, G. (2017). *Drosophila melanogaster* as a High-Throughput model for host-microbiota interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8, 8.
- Roer, L., Hendriksen, R. S., Leekitcharoenphon, P., Lukjancenko, O., Kaas, R. S., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2016). Is the evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* linked to restriction-modification systems? *MSystems*, 1(3), mSystems.00009-16, e00009-16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-16>
- Ryan, M. P., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the complex nomenclature of the clinically and veterinary significant pathogen

Salmonella. *BioMed Research International*, 2017, 1-6.

<https://doi.org/10.1155/2017/3782182>

Salazar, A. M., Resnik-Docampo, M., Ulgherait, M., Clark, R. I., Shirasu-Hiza, M., Jones, D. L., & Walker, D. W. (2018). Intestinal snakeskin limits microbial dysbiosis during aging and promotes longevity. *IScience*, 9, 229-243.

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.022>

Schretter, C. E., Vielmetter, J., Bartos, I., Marka, Z., Marka, S., Argade, S., & Mazmanian, S. K. (2018). A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature*, 563(7731), 402-406.

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0634-9>

Shaw, B., Fountain, M. T., & Wijnen, H. (2018). Recording and reproducing the diurnal oviposition rhythms of wild populations of the soft- and stone- fruit pest *Drosophila* *suzukii*. *PLOS ONE*, 13(10), e0199406.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199406>

Shell, B. C., Schmitt, R. E., Lee, K. M., Johnson, J. C., Chung, B. Y., Pletcher, S. D., & Grotewiel, M. (2018). Measurement of solid food intake in *Drosophila* via consumption-excretion of a dye tracer. *Scientific Reports*, 8(1), 11536.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29813-9>

Shirasu-Hiza, M. M., Dionne, M. S., Pham, L. N., Ayres, J. S., & Schneider, D. S. (2007). Interactions between circadian rhythm and immunity in *Drosophila*

melanogaster. *Current Biology*, 17(10), R353-R355.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.049>

Silva, C., Calva, E., & Maloy, S. (2017). One Health and Food-Borne Disease: *Salmonella* Transmission between Humans, Animals, and Plants. 9. Microbiology Spectrum. American Society for Microbiology Press. San Diego, C.A. doi:10.1128/microbiolspec.OH-0020-2013.

Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R., & Saxena, M. K. (2018). Virulence system of *Salmonella* with special reference to *Salmonella enterica*. En M. T. Mascellino (Ed.), *Salmonella—A Re-emerging Pathogen*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77210>

Siriken, B. (2013). *Salmonella Patojenite Adaları*. 8. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 181-188. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.09.2012. Turkey.

Siva-Jothy, J. A., Prakash, A., Vasanthakrishnan, R. B., Monteith, K. M., & Vale, P. F. (2018). Oral bacterial infection and shedding in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, 135, 57676. <https://doi.org/10.3791/57676>

Smith, S. I., Seriki, A., & Ajayi, A. (2016). Typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* infections in Africa. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(12), 1913-1922. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2760-3>

Soldano, A., Alpizar, Y. A., Boonen, B., Franco, L., López-Requena, A., Liu, G., Mora, N., Yaksi, E., Voets, T., Vennekens, R., Hassan, B. A., & Talavera, K.

(2016). Gustatory-mediated avoidance of bacterial lipopolysaccharides via TRPA1 activation in *Drosophila*. *ELife*, 5, e13133. <https://doi.org/10.7554/eLife.13133>

Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45(2), 455-481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>

Sridhar, S., & Steele-Mortimer, O. (2016). Inherent variability of growth media impacts the ability of *Salmonella* Typhimurium to interact with host cells. *PLOS ONE*, 11(6), e0157043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157043>

Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole—moving with the times. *Current Opinion in Microbiology*, 11(1), 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.002>

Steinert, M., Leippe, M., & Roeder, T. (2003). Surrogate hosts: protozoa and invertebrates as models for studying pathogen-host interactions. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(5), 321-332. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00275>

Stevanovic, A. L., Arnold, P. A., & Johnson, K. N. (2015). Wolbachia-mediated antiviral protection in *Drosophila* larvae and adults following oral infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8215-8223. <https://doi.org/10.1128/AEM.02841-15>

- Stier, H., & Bischoff, S. C. (2017). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 beeinflusst das darmassoziierte Immunsystem. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 159(S5), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s15006-017-9802-3>
- Stoffels, L., Krehenbrink, M., Berks, B. C., & Uden, G. (2012). Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 475-485. <https://doi.org/10.1128/JB.06014-11>
- Tanner, J. R., & Kingsley, R. A. (2018). Evolution of *Salmonella* within hosts. *Trends in Microbiology*, 26(12), 986-998. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.001>
- Droid (2018). *The Drosophila Interactions Database*. <http://www.droidb.org/>
- Thiennimitr, P., Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Tolstikov, V., Huseby, D. L., Sterzenbach, T., Tsohis, R. M., Roth, J. R., & Baumler, A. J. (2011). Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17480-17485. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107857108>
- Torri, A., Mongelli, V., Mondotte, J. A., & Saleh, M.-C. (2020). Viral infection and stress affect protein levels of dicer 2 and argonaute 2 in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Immunology*, 11, 362. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00362>

- Tzou, P., Reichhart, J.-M., & Lemaitre, B. (2002). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2152-2157. <https://doi.org/10.1073/pnas.042411999>
- United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. (2016). <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/footer/>
- United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. (2018). <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/salmonella/sa>
- U.S. Food & Drug Administration. (2018). <https://www.fda.gov/animal-veterinary/news-events/fda-investigates-outbreak-salmonella-infections-linked-raws-paws-ground-turkey-food-pets>
- Vale, P. F., & Jardine, M. D. (2015). Sex-specific behavioural symptoms of viral gut infection and *Wolbachia* in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 82, 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.08.005>
- Velasco-Carrillo, J., Araque-Granadillo, M., Ayala-Serrano, J., Dávila-Vera, D., Peña, Z., & Mendoza-Briceño, R. (2019). Patogenia de mutantes de *Salmonella* Typhimurium en dos modelos experimentales in vivo. 8.
- Verma, S., & Srikanth, C. V. (2015). Understanding the complexities of *Salmonella*-host crosstalk as revealed by *in vivo* model organisms: Model Systems of

Salmonella-host crosstalk. *IUBMB Life*, 67(7), 482-497.

<https://doi.org/10.1002/iub.1393>

Villalpando-Guzmán, S., Vázquez-Quiñones, C. R., Natividad-Bonifacio, I., Curiel-Quesada, E., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2017). Frecuencia, susceptibilidad antimicrobiana y patrón de adherencia de *Salmonella enterica* aislada de carne de pollo, res y cerdo de la Ciudad de México. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 458-466. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500458>

Waldner, L., MacKenzie, K., Köster, W., & White, A. (2012). From exit to entry: long-term survival and transmission of *Salmonella*. *Pathogens*, 1(2), 128-155. <https://doi.org/10.3390/pathogens1020128>

Wang, M., Qazi, I. H., Wang, L., Zhou, G., & Han, H. (2020). *Salmonella* virulence and immune escape. *Microorganisms*, 8(3), 407. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030407>

Wen, Y., He, Z., Xu, T., Jiao, Y., Liu, X., Wang, Y.-F., & Yu, X.-Q. (2019). Ingestion of killed bacteria activates antimicrobial peptide genes in *Drosophila melanogaster* and protects flies from septic infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 95, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.02.001>

Winter, S. E., Winter, M. G., Poon, V., Keestra, A. M., Sterzenbach, T., Faber, F., Costa, L. F., Cassou, F., Costa, E. A., Alves, G. E. S., Paixão, T. A., Santos,

- R. L., & Bäumlér, A. J. (2014). *Salmonella enterica* Serovar Typhi Conceals the invasion-associated type three Secretion System from the innate immune system by gene regulation. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004207. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004207>
- Woods, J. K., Kowalski, S., & Rogina, B. (2014). Determination of the spontaneous locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, 86, 51449. <https://doi.org/10.3791/51449>
- World Health Organization. *Salmonella (non-typhoidal)*. (2018). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Younes, S., Al-Sulaiti, A., Nasser, E. A. A., Najjar, H., & Kamareddine, L. (2020). *Drosophila* as a model organism in host–pathogen interaction studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 214. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00214>
- Zhang, X., He, L., Zhang, C., Yu, C., Yang, Y., Jia, Y., Cheng, X., Li, Y., Liao, C., Li, J., Yu, Z., & Du, F. (2019). The impact of sseK2 deletion on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence *in vivo* and *in vitro*. *BMC Microbiology*, 19(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1543-2>

ANEXO I. ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

♂. Macho

♀. Hembra

ALD. Abajo del Límite de Detección

ATPasa. Enzima que cataliza la descomposición de ATP

CD18. Antígeno CD del Sistema inmunitario de mamíferos expresado en leucocitos (Cluster of Differentiation).

DC. Células Dendríticas

EROS. Especies Reactivas de Oxígeno

ETA. Enfermedad Transmitida por Alimentos

IL-8. Interleucina-8. Citoquina proinflamatoria,

LB. Caldo Luria – Bertani

LPS. Lipopolisacárido

MAPK. Proteína quinasa activada por mitógenos (siglas en inglés)

NF-κB. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

ORR. Oregon – *R. D. melanogaster*

PAMP. Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (siglas en inglés)

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PP. Placas de Peyer

PRR. Receptores de reconocimiento de patrones

pSLT. Plásmidos de virulencia de *S. Typhimurium*

rfc. Fuerza centrífuga relativa o fuerza g, dependiente de rpm

rpm. Revoluciones por minuto

SCV. Vacuola que contiene a *Salmonella* (siglas en inglés)

SNT. *Salmonella* No Tifoidea

SPI. Isla de Patogenicidad de *Salmonella* (siglas en inglés)

SPI-1. Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 1

SPI-2. Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 2

SPI-3 Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 3

SPI-4 Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 4

SPI-5 Isla de Patogenicidad de *Salmonella* 5

SSE. Solución Salina Estéril

SSF. Solución Salina Fisiológica

ST. *Salmonella* Tifoidea

T3SS. Sistema de Secreción Tipo 3 (siglas en inglés)

TLR. Receptores tipo Toll (siglas en inglés)

TNF. Factor de Necrosis Tumoral (siglas en inglés). Proteínas de las citoquinas proinflamatorias.

UFC. Unidades Formadoras de Colonias

XLD + N. Agar Xilosa Lisina Desoxicolato más novobiocina

yw. yellow white. D. melanogaster

ANEXO II. Prueba de Ovoposición

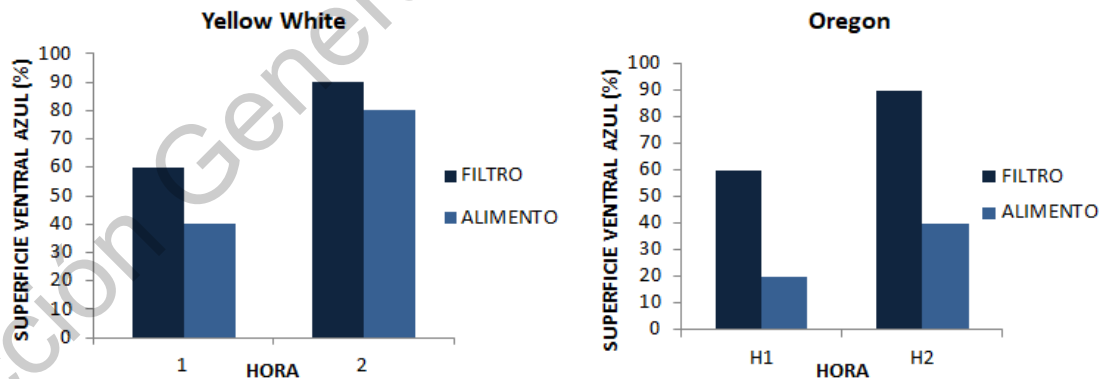
La selección del sitio de ovoposición en *D. melanogaster* resulta imprescindible para obtener un éxito reproductivo. Se ha demostrado que las hembras, tienen alta afinidad por levaduras como sustrato de ovoposición (Joseph et al., 2009).

Al proponer una variante de la formulación de alimento, sin levadura, resultó necesario verificar, antes de iniciar con los ensayos de infección, que los organismos no se vieran afectados en su ciclo reproductivo debido a la modificación de su dieta. Es por ello que se realizó la prueba de ovoposición, mencionada en el numeral 5.1.3 de la metodología.

En hembras vírgenes de *D. melanogaster* bajo régimen de alimentación estándar (con levadura), se ha reportado puestas de huevos entre 60 y 100 por ovoposición (Menon et al., 2014); en las pruebas de ovoposición con organismos vírgenes de la estirpe Oregon – R bajo régimen de alimentación sin levadura, se obtuvieron entre 93 y 100 huevos por puesta. Estos resultados, hacen referencia con el estudio reportado por Liu y colaboradores, donde sugieren que la ovoposición de hembras *D. melanogaster* no está influenciada por las conductas alimenticias o por su preferencia por la levadura (Liu et al., 2017). Esto sugiere que el cambio de dieta en la estirpe Oregon – R no impide el éxito reproductivo de los organismos bajo estas condiciones.

ANEXO III. Indicador de consumo de inóculo

Se seleccionaron dos grupos de organismos hembras y machos de la estirpe *yellow white* y Oregon – R de *D. melanogaster*. Los grupos de organismos se sometieron a un ayuno de dos horas, posteriormente fueron colocados en los viales correspondientes con el inóculo conformado por caldo LB estéril, colorante azul brillante No. 1 al 1%, y agua destilada estéril (Torri et al., 2020). El primer grupo de organismos de cada estirpe fue colocado en viales que contenían el inóculo depositado en un papel filtro estéril, de acuerdo a la metodología de (Hori et al., 2018); mientras que el segundo grupo de cada estirpe fue colocado en viales que contenían el inóculo en la superficie del alimento estéril, de acuerdo a la metodología reportada por (Siva-Jothy et al., 2018). Los organismos se dejaron a exposición del inóculo y se realizaron conteos de los organismos que presentaron superficie ventral abdominal azul pasado un periodo de exposición de una y dos horas. De esta manera, se elige colocar el inóculo en papel filtro para los ensayos posteriores. Después de dos horas de exposición el 90% de organismos presentan superficie ventral abdominal azul para ambas estirpes.



Gráfica 16 Indicador de consumo de inóculo.

El gráfico de la izquierda corresponde a estirpe *yellow white*, gráfico de la derecha a estirpe Oregon – R. Las barras azul marino corresponden a la vía de infección mediante la colocación del inóculo en papel filtro; las barras azul claro, a la adición del inóculo en la superficie del alimento.

ANEXO IV. Muestras seleccionadas para confirmación molecular en desafíos de infección oral con *S. enterica* en *D. melanogaster*

Cuadro 9. Matriz de identificación de *Salmonella* en confirmación molecular

No.	DESAFÍO	DÍA POST INFECCIÓN	16S rRNA	invA
1	ORR Lev (-) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	6	+	+
2	yw Lev (-) macho + <i>S. Typhimurium</i>	6	+	+
3	yw Lev (-) macho + <i>S. Enteritidis</i>	8	+	+
4	yw Lev (-) macho + <i>S. Typhimurium</i>	8	+	+
5	yw Lev (-) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	4	+	+
6	yw Lev (-) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	6	+	+
7	yw Lev (-) hembra + <i>S. Typhimurium</i>	6	+	+
8	yw Lev (-) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	8	+	+
9	ORR Lev (+) macho + <i>S. Enteritidis</i>	0	+	+
10	ORR Lev (+) macho + <i>S. Enteritidis</i>	6	+	+
11	ORR Lev (+) macho + <i>S. Typhimurium</i>	6	+	+
12	ORR Lev (+) macho + <i>S. Enteritidis</i>	8	+	+
13	ORR Lev (+) macho + <i>S. Typhimurium</i>	8	+	+
14	ORR Lev (+) hembra + <i>S. Typhimurium</i>	4	+	+
15	ORR Lev (+) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	6	+	+
16	ORR Lev (+) hembra + <i>S. Enteritidis</i>	8	+	+
17	ORR Lev (+) hembra + <i>S. Typhimurium</i>	8	+	+

No.	DESAFÍO	DÍA POST INFECCIÓN	16S rRNA	invA
18	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	0	+	+
19	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	4	+	+
20	ORR Lev (-) macho + S. Enteritidis	6	+	+
21	ORR Lev (-) macho + S. Enteritidis	8	+	+
22	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	8	+	+
23	ORR Lev (-) hembra + S. Enteritidis	4	+	+
24	ORR Lev (-) hembra + S. Enteritidis	6	-	+
25	ORR Lev (-) hembra + S. Enteritidis	8	+	+
26	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	8	+	+
27	Control positivo S. Typhimurium		+	+
28	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	0	+	+
29	ORR Lev (-) macho + S. (+ SPI-1)	0	+	+
30	ORR Lev (-) macho + S. (- SPI-1)	0	+	+
31	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	2	+	+
32	ORR Lev (-) macho + S. (+ SPI-1)	2	+	+
33	ORR Lev (-) macho + S. (- SPI-1)	2	+	+
34	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	4	+	+
35	ORR Lev (-) macho + S. (+ SPI-1)	4	+	+
36	ORR Lev (-) macho + S. (- SPI-1)	4	+	+
37	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	6	+	+
38	ORR Lev (-) macho + S. (+ SPI-1)	6	+	+

No.	DESAFÍO	DÍA POST INFECCIÓN	16S <i>rRNA</i>	<i>invA</i>
39	ORR Lev (-) macho + S. (- SPI-1)	6	+	+
40	ORR Lev (-) macho + S. Typhimurium	8	+	+
41	ORR Lev (-) macho + S. (+ SPI-1)	8	+	+
42	ORR Lev (-) macho + S. (- SPI-1)	8	+	+
43	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	0	+	+
44	ORR Lev (-) hembra + S. (- SPI-1)	0	+	+
45	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	2	+	+
46	ORR Lev (-) hembra + S. (+ SPI-1)	2	+	+
47	ORR Lev (-) hembra + S. (- SPI-1)	2	+	+
48	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	4	+	+
49	ORR Lev (-) hembra + S. (+ SPI-1)	4	+	+
50	ORR Lev (-) hembra + S. (- SPI-1)	4	+	+
51	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	6	+	+
52	ORR Lev (-) hembra + S. (+ SPI-1)	6	+	+
53	ORR Lev (-) hembra + S. (- SPI-1)	6	+	+
54	ORR Lev (-) hembra + S. Typhimurium	8	+	+
55	ORR Lev (-) hembra + S. (+ SPI-1)	8	+	+
56	ORR Lev (-) hembra + S. (- SPI-1)	8	+	+