



Universidad Autónoma De Querétaro

Facultad De Química

Prevalencia y diversidad de genes asociados a infecciones sistémicas en aislamientos de *Salmonella enterica* recuperados a partir de productos cárnicos avícolas

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

I.B.T JESÚS HÉCTOR WONG LIZÁRRAGA

DIRIGIDO POR

Dr. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

QUERÉTARO, Qro, a Junio 2022.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Prevalencia y diversidad de genes asociados a infecciones sistémicas en aislamientos de *Salmonella enterica* recuperados a partir de productos cárnicos avícolas

TESIS

COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

JESÚS HÉCTOR WONG LIZÁRRAGA

DIRIGIDO POR:

Dr. GERARDO MANUEL NAVA MORALES

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales

Presidente

Dr. Carlos Eslava Campos

Secretario

MIM. David G. García Gutiérrez

Vocal

Dr. Edmundo M. Mercado Silva

Suplente

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios

Suplente

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

Dr. Gerardo Manuel Nava Morales
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Junio, 2022.
México

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Importancia de la carne de pollo	12
2.2 Generalidades y filogenia de <i>Salmonella</i>	14
2.3 Impacto de la salmonelosis en humanos	17
2.4 Prevalencia de <i>Salmonella</i> en carne de pollo	18
2.5 Patogénesis y <i>Salmonella</i> iNTS	18
2.5.1 Plásmidos de virulencia en <i>S. enterica</i> asociados a infecciones sistémicas	20
2.5.2 Islas de la patogenicidad requeridas para la función de <i>spvRABCD</i>	22
2.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como modelo para estudiar la interacción huésped-patógeno	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	28
4.1 General	28
4.2 Específicos	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1 Identificación de genes asociados a infecciones sistémicas mediante métodos bioinformáticos	29
5.2 Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de qPCR	30
5.3. Estandarización de la qPCR para detectar el operón	31

<i>spvRABCD</i>	
5.3.1 Cepas utilizadas en el estudio y extracción de ADN	33
5.3.2 Identificación de genes asociados a invasividad mediante ensayos de qPCR	34
5.4 Cultivo y mantenimiento de <i>Drosophila melanogaster</i>	34
5.4.1 Elaboración del alimento para <i>Drosophila melanogaster</i>	35
5.4.2 Preparación del inóculo	35
5.4.3 Procedimiento de infección de <i>D. melanogaster</i>	36
5.4.4 Análisis de la replicación y supervivencia de <i>S. enterica</i> en <i>D. melanogaster</i>	36
5.5 Análisis estadístico	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1 Distribución del operón <i>spvRABCD</i> en genomas y plásmidos de <i>S. enterica</i>	37
6.2 Ensayo molecular de detección del operón <i>spvRABCD</i> en aislamientos de <i>S. enterica</i> provenientes de carne de pollo	40
6.3 Desafío de <i>D. melanogaster</i> vs. operón <i>spvRABCD</i>	42
7. CONCLUSIÓN	45
8. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Distribución de serotipos de <i>Salmonella</i> por especie y subespecie	14
Tabla 2	Serotipos de <i>S. enterica</i> aislada en diferentes matrices alimentarias	15
Tabla 3	Función de los genes presentes en el operón <i>spvRABCD</i>	21
Tabla 4	Islas de patogenicidad de <i>S. enterica</i>	23
Tabla 5	Distribución del operón <i>spvRABCD</i> en diferentes huéspedes	29
Tabla 6	Parámetros de diversidad de secuencias del operón <i>spvRABCD</i> en plásmidos y genomas	30
Tabla 7	Iniciadores reportados para qPCR	31
Tabla 8	Protocolo de qPCR para detección de <i>spvRABCD</i>	32
Tabla 9	Parámetros de amplificación para operón <i>spvRABCD</i>	32
Tabla 10	Protocolo de reacciones de qPCR para la detección de <i>spvRABCD</i>	34
Tabla 11	Formulación del inóculo	35
Tabla 12	Códigos empleados en el desafío de <i>Salmonella</i> con <i>D. melanogaster</i>	36
Tabla 13	Total de secuencias obtenidas del operón <i>spvRABCD</i> en genomas y plásmidos de <i>S. enterica</i>	37
Tabla 14	Prevalencia del operón <i>spvRABCD</i> dentro de los aislamientos de carne de pollo (2016).	40
Tabla 15	Distribución y prevalencia del operón <i>spvRABCD</i> en serotipos de <i>S. enterica</i> , 2016	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Consumo <i>per cápita</i> de carne de pollo 2020	12
Figura 2	Producción de carne de pollo en México y otros países a nivel mundial en 2020	13
Figura 3	Estados con mayor producción de carne de pollo en México	13
Figura 4	Antígenos O y H presentes en <i>Salmonella</i>	15
Figura 5	Diseminación sistémica de <i>S. enterica</i>	20
Figura 6	Mecanismo del operón <i>spvRABCD</i>	22
Figura 7	Esquema del tracto intestinal de mamíferos y de <i>D. melanogaster</i>	24
Figura 8	Gráficas presentadas por el equipo CTX1000 Real Time qPCR	33
Figura 9	Distribución de serotipos del operón <i>spvRABCD</i> en plásmidos	38
Figura 10	Distribución de serotipos del operón <i>spvRABCD</i> en genomas	39
Figura 11	Replicación de <i>Salmonella</i> en <i>D. melanogaster</i>	43
Figura 12	Supervivencia de <i>D. melanogaster</i> vs. <i>Salmonella</i>	44

Declaración de Responsabilidad del 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.



I.B.T. Jesús Héctor Wong Lizárraga

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme una beca durante mi estancia en la realización de este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al programa de Posgrado en Alimentos por la oportunidad de continuar mis estudios en esta institución, así como todos los aprendizajes adquiridos.

A mi familia por siempre apoyarme, por darme el apoyo físico y emocional que siempre he necesitado. A mi madre, quiero decirte que esto es solo el primer paso al éxito y a una vida increíble. A mis hermanos por su sentido del humor, porque lograron alejar las nubes negras de mi vida. A Shený muchas gracias.

A mi compañera de vida, a Sarahí por marcar el hito en mi vida de iniciar y terminar esta maestría, por ser esa persona que me impulsa a seguir hacia adelante y seguir creciendo, me enseñaste que puedo mantener la con la cabeza en alto y siempre tener confianza en mis capacidades. Gracias, por tanto.

A mis amigos que han estado a mi lado desde el principio, por escuchar mis pesares y siempre acompañarme cuando más bajo he caído.

A mi asesor el Dr. Nava por su apoyo y por todo el conocimiento nuevo, a mis compañeros de la maestría que siempre me tendieron la mano y quisieron ayudarme, a los doctores que me dieron consejos y quisieron que saliera adelante, a los muchachos del servicio y a los técnicos que me ya se fueron, hicieron que todo esto valiera la pena.

También quiero agradecerle a la vida por darme las herramientas y tantas experiencias buenas y malas. Me has hecho crecer.

RESUMEN

Salmonella enterica es uno de los principales patógenos responsable de infecciones intestinales a nivel mundial. La mayoría de los serotipos de *Salmonella enterica* causan una enfermedad local y autolimitante; sin embargo, en años recientes en animales y humanos, se ha observado un aumento considerable en el número de infecciones sistémicas causadas por *S. enterica*. Estudios genómicos comparativos han revelado que la capacidad de translocar la mucosa intestinal e invadir tejidos está relacionada con la presencia del operón *spvRABCD*, integrado por los genes R, A, B, C y D. Basado en esta premisa, el objetivo del presente trabajo fue identificar la prevalencia y diversidad del operón *spvRABCD* en aislamientos de *S. enterica* recuperados a partir de productos cárnicos avícolas, y evaluar su potencial de virulencia en un modelo de infección con *Drosophila melanogaster*. Para este fin, 89 aislamientos recuperados durante 12 meses se sometieron a ensayos de qPCR dirigidos a la detección del operón *spvRABCD*. El operón completo se observó en 71.9%, mientras que el operón con 4, 3 y 2 genes se identificaron en 8.9%, 6.7 y 2.2% de los aislamientos; respectivamente. Desafíos por vía oral de *D. melanogaster* revelaron que la presencia del operón completo en *S. enterica* aumenta ($P < 0.05$) la replicación y mortalidad comparado con cepas que poseen el operón parcial (4 y 2 genes) y sin operón. En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia del operón *spvRABCD* podría ser un factor de virulencia importante para el patógeno; además, este trabajo revela que los aislamientos de *S. enterica* que circulan en la industria cárnica avícola, tienen potencial de virulencia para causar infecciones sistémicas.

Palabras clave: *Salmonella*, pollo, *Drosophila melanogaster*, infección sistémica, qPCR

ABSTRACT

Salmonella enterica remains the main pathogen responsible for intestinal infections worldwide. Most of *Salmonella enterica* serotypes cause local, self-limiting disease; however, in recent years, it has been observed an increase in the number of systemic infections caused by *S. enterica* in animals and humans. Comparative genomic studies have revealed that the ability to translocate the intestinal mucosa and invade tissues is associated to the presence of a *spvRABCD* operon, composed by R, A, B, C and D genes. Based on this premise, the objective of present was to identify the prevalence and diversity of the *spvRABCD* operon in *S. enterica* isolates recovered from poultry meat products, and to assess their virulence potential in a *Drosophila melanogaster*. For this purpose, 89 isolates recovered during a 12-month survey were subjected to qPCR assays targeting detection of the *spvRABCD* operon. Full operon was observed in 71.9% of isolates, whereas operons with 4, 3 and 2 genes were identified in 8.9%, 6.7 and 2.2% of the strains, respectively. *D. melanogaster* subjected to *S. enterica* oral challenge revealed that the presence of full operon increased ($P < 0.05$) replication and mortality compared to strains possessing partial operon (4 and 2 genes) and no operon. Taken together, these results suggest that *spvRABCD* could be an important virulence factor for this pathogen; moreover, the present work reveals that the isolates of *S. enterica* that circulate in the poultry meat industry have virulence potential to cause systemic infections.

Keywords: *Salmonella*, poultry, *Drosophila melanogaster*, systemic infection, qPCR

1. INTRODUCCIÓN

Salmonella enterica es una bacteria que ocasiona graves problemas de salud a nivel mundial. Este patógeno se ha asociado a infecciones gastrointestinales y a enfermedades sistémicas (OMS, 2022). Las enfermedades sistémicas se manifiestan cuando *S. enterica* atraviesa el epitelio intestinal hacia el sistema circulatorio, a través de las células M, los enterocitos y los macrófagos (Kurtz, Goggins & McLachlan, 2017). Cuando *S. enterica* alcanza el sistema circulatorio, puede colonizar diferentes tejidos y órganos, ocasionando una infección sistémica con altas tasas de mortalidad en pacientes afectados (Gilchrist & MacLennan, 2019).

Los reservorios de *S. enterica* son diversas; sin embargo, se ha considerado que los productos cárnicos avícolas podrían ser una de las principales fuentes de infección para humanos (CDC, 2020). Existen numerosos estudios que han revelado una elevada prevalencia (20-30%) de *S. enterica* en productos cárnicos avícolas. (Zeng et al., 2021) Sin embargo, pocos estudios han analizado el potencial de virulencia de los aislamientos recuperados a partir de carne de pollo. En este contexto, algunos estudios han revelado que los aislamientos obtenidos a partir de muestras de animales o productos cárnicos pueden presentar una amplia gama de genes que codifican para factores de virulencia y resistencia a antibióticos (Bahramianfard, 2021).

Algunos estudios con aislamientos de *S. enterica* han evidenciado la presencia de factores de virulencia que promueven infecciones sistémicas (Frias, 2009). Se ha demostrado que cepas de *S. enterica* que poseen el operón *spvRABCD* tiene la capacidad de colonizar la mucosa intestinal, translocar el epitelio e invadir órganos y tejidos (Guiney & Fierer, 2011); no obstante, las principales fuentes de cepas con el operón *spvRABCD* y su prevalencia se desconocen hasta el momento. Basado en esta premisa, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una estrategia molecular para evaluar la prevalencia y diversidad de *S. enterica* invasiva en

productos cárnicos avícolas. Los resultados del presente estudio serán fundamentales para identificar posibles fuentes que contribuyan a la replicación y dispersión de este patógeno.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Importancia de la carne de pollo

La carne es una de las principales fuentes de proteína en la dieta de los seres humanos, las especies más consumidas son las aves, cerdos y ganado. Dentro de las aves, la carne de pollo es la más consumida en México; en el año 2020 se estimó que el consumo per cápita fue de ~35 kg (Hernández, 2021) (**Figura 1**).

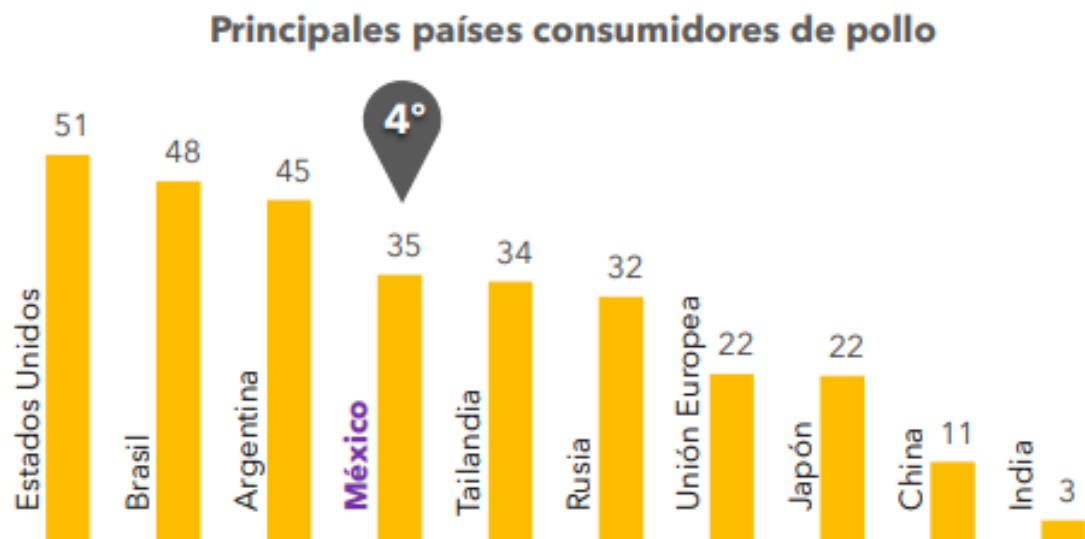


Figura 1: Consumo *per cápita* de carne de pollo 2020 (Tomado de Hernández, 2021).

México es el séptimo productor de carne de pollo a nivel mundial (**Figura 2**); según los datos de la Unión Nacional de Avicultores, en el año 2021 se produjeron casi 3.5 millones de toneladas de carne de pollo en nuestro país, representando un crecimiento del 21.6 % durante el periodo 2010 – 2020. Esta producción se concentra en cinco estados (**Figura 3**) los cuales representan el 53 % de la

producción total (Hernández, 2021).

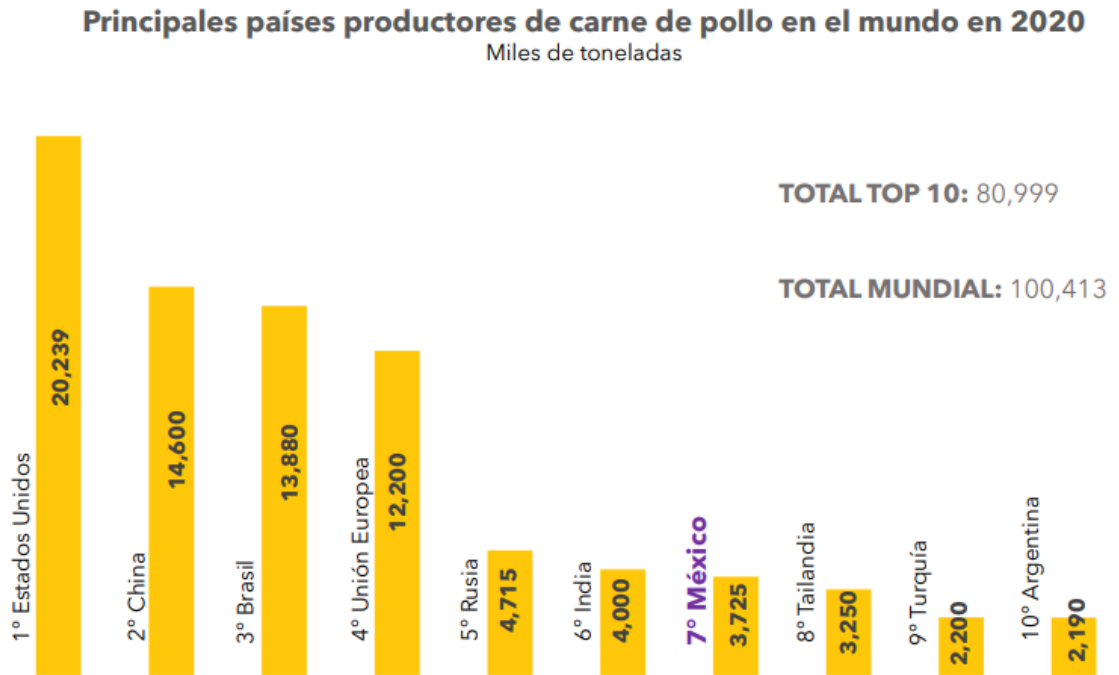


Figura 2: Producción de carne de pollo en México y otros países a nivel mundial en 2020 (Tomado de Hernández, 2021).

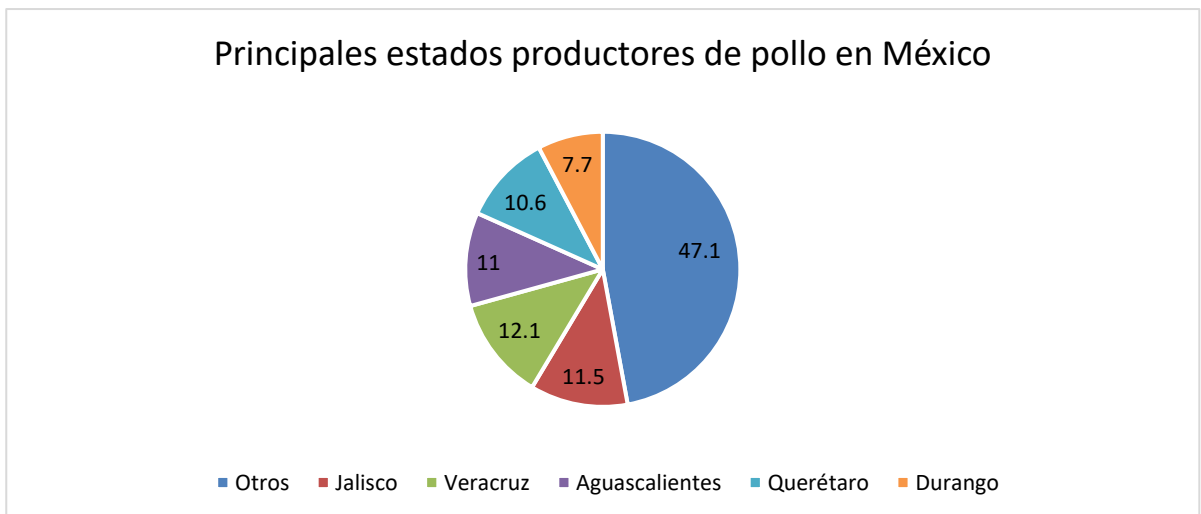


Figura 3. Estados con mayor producción de carne de pollo en México, 2020. (Hernández, 2021).

2.2 Generalidades y filogenia de *Salmonella*

S. enterica se encuentra distribuida mundialmente y es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos, debido a los altos niveles de prevalencia tanto en alimentos frescos como en alimentos procesados o deshidratados (OMS, 2022). El reservorio común de este patógeno es el intestino de diferentes especies de mamíferos, aves, réptiles e insectos (Krawiec et al., 2015). El género *Salmonella* se divide en 2 especies, *S. entérica* y *S. bongori*. La primera se subdivide en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; en general *Salmonella* cuenta con 2579 serotipos reportados (**Tabla 1**).

Tabla 1: Distribución de serotipos de *Salmonella* por especie y subespecie.

Especies y subespecies de <i>Salmonella</i>	Serotipos
<i>S. enterica</i>	2 557
- subsp. <i>enterica</i>	1 531
- subsp. <i>salamae</i>	505
- subsp. <i>arizonae</i>	99
- subsp. <i>diarizonae</i>	336
- subsp. <i>houtenae</i>	73
- subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total de serotipos	2 579

(Adaptado de: Grimont & Weill, 2007)

Debido a la gran diversidad de serotipos, se desarrolló una técnica de serotipificación basada en la caracterización de los antígenos flagelares y somáticos, identificados como antígeno H y O, respectivamente (Cheng et al., 2019) (**Figura 4**).

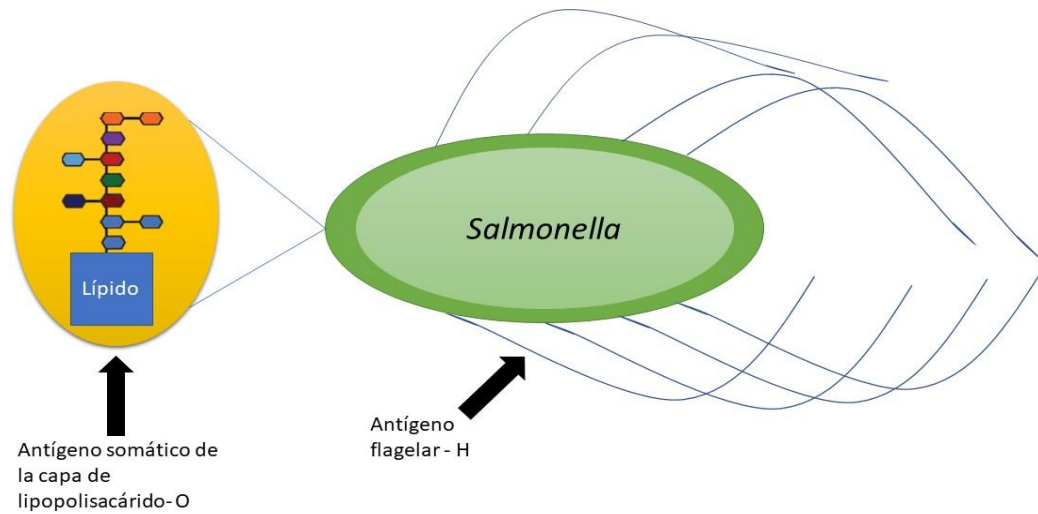


Figura 4: Antígenos O y H presentes en *Salmonella*.

(Adaptado de: Teunis, et al., 2010 y Cheng, 2019)

Los principales serotipos de *S. enterica* presentes en alimentos son Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, Napoli, Barielly, Oranienburg y Zanzibar (**Tabla 2**).

Tabla 2. Serotipos de *S. enterica* aislada de diferentes matrices alimentarias.

Referencia y Serotipo	Vehículo	Dosis infectante (UFC/ml)
S. Enteritidis Hennessy et al. (1996)	Helado	8.94×10^1
	Hollandaise	4.48×10^4
Hennessy et al. (1996)	Crema de maní	2.50×10^1
	Cacahuates	34.4
(Vought & Tatini 1998)	Res/ frijoles/ sésamo	8.80×10^2
	Espinaca/cacahuete	4.90×10^1
Center for Disease Control and Prevention (CDC) (1996)	Ensalada de macarrones	4.40×10^4
	Pollo/huevos/arroz	4.17×10^3

	Pollo/huevos/arroz	4.17×10^3
Kasuga et al. (2004)	Ensalada de huevo	2.40×10^1
	Filete de res sellado	2.42×10^5
Evans et al. (1999)	Omelette delgado	6.06×10^3
Matsui et al. (2004)	Omelette	1.51×10^5
	Camaron/huevo	9.69×10^4
	Huevo	10.9
	Salsa de crema	1.00×10^6
	Natto/huevos	7.27×10^5
	Ñame/sopa	1.94×10^6
	Ensalada de espagueti	1.45×10^7
	Omelette	2.42×10^5
	Bavarois	1.01×10^5
	Helado	3.84×10^6
	Pastel	4.24×10^2
	Tiramisú	1.29×10^8
	Pastel	6.06×10^5
	Mayonesa	5.57×10^4
	Bollo de postre	4.1
Platillo de arroz	1.50×10^6	

Continuación de **Tabla 2.**

Referencia y Serotipo	Vehículo	Dosis infectante (UFC/ml)
S. Typhimurium Boring et al. (1971)	Agua	2.04×10^2
	Agua	2.04×10^2
	Helado	1.00×10^8
S. Heidelberg Fontaine et al. (1978)	Queso	1.66×10^2
S. Infantis Angelotti et al. (1961)	Jamón	2.63×10^6
S. Napoli Greenwood & Hooper (1983)	Chocolate	1.71×10^1
S. Bareilly Kasuga et al. (2004)	Salsa de pulpo	1.41×10^7
S. Oranienburg Kasuga et al. (2004)	Ñame/sopa	7.57×10^9
S. Zanzibar Reitler et al. (1960)	Queso de cabra	1.00×10^{11}

2.3 Impacto de la salmonelosis en humanos

La salmonelosis es una infección ocasionada por *Salmonella* no tifoidea (NTS por sus siglas en inglés) que ocasiona cuadros de gastroenteritis en el humano. Los datos epidemiológicos a nivel mundial indican que *Salmonella* NTS causan 550 millones de infecciones entéricas al año, donde 220 millones son pacientes menores a 5 años de edad; además de causar 33 millones de muertes (OMS, 2022). En México nuestro boletín epidemiológico indica que para junio del presente año se han tenido 15300 infecciones por parte de *Salmonella* (Secretaría de Salud, 2022).

En los EE. UU., se estima que anualmente *Salmonella* causa alrededor de 1.35 millones de infecciones, 26,500 hospitalizaciones y 420 muertes (CDC, 2022); En el periodo comprendido entre los años 2006 a 2022, se registraron 106 brotes de *S. enterica* asociados al consumo de alimentos, de los cuales aproximadamente el 10% causado por productos cárnicos avícolas. (CDC, 2022). El CDC reporta que los serotipos de *Salmonella* más prevalentes en carne de pollo son Enteritidis (50.28%), Heidelberg (50.01%) y Typhimurium (9.99%) (CDC, 2022; Scallan et al., 2011).

2.4 Prevalencia de *Salmonella* en carne de pollo

S. enterica es una bacteria patógena capaz de colonizar el intestino de varios animales vertebrados, como mamíferos, aves y algunos reptiles (OMS, 2022). Estudios han revelado que la prevalencia de este patógeno en granjas de pollos varía del 5% al 100%, en muestras ambientales y fecales (Rodríguez et al., 2006). Además, se ha reportado que los serotipos más prevalentes en la carne de pollo son Enteritidis, Kentucky, Heidelberg y Typhimurium (Haley et al., 2012).

En México, un estudio longitudinal (2016-2018) demostró que la prevalencia de *S. enterica* en carne de pollo obtenida en puntos de venta fue de ~18%; además, la presencia del patógeno duplicó en los últimos 3 años evaluados en el estudio (Regalado-Pineda et al., 2020). Estos datos resaltan la necesidad de establecer programas de vigilancia y medidas sanitarias de control para disminuir la prevalencia y posible transmisión de este patógeno a través de alimentos contaminados.

2.5 Patogénesis y *Salmonella* iNTS

En los seres humanos, una vez que se ingieren alimentos contaminados con *S. enterica*; se requiere de 12 a 72 horas para que se manifiestan los síntomas de la enfermedad, la cual puede durar de 4 a 7 días, provocando cuadros de gastroenteritis y fiebre (Blaser et al., 1982). Se ha reportado que la dosis mínima

infectante puede variar de 1,000 a 10,000 células, y esta diferencia se puede atribuir a la virulencia de cada cepa (Teunis et al., 2010).

Salmonella tiene la capacidad de producir diversos cuadros clínicos, clasificados por los síntomas que produce en el huésped; por ejemplo, fiebre tifoidea causada por cepas de *Salmonella* tifoidea (Dougan & Baker, 2014). Cuadros de gastroenteritis causados por *Salmonella* no tifoidea (NTS) (Shannon et al., 2010); y *Salmonella* invasiva no tifoidea (iNTS; por sus siglas en inglés), causada por los serotipos que tienen la capacidad de invadir diversos órganos y tejidos (Nataro, 2004). Diversos estudios han revelado que estos patógenos se transmiten al ser humano principalmente por el consumo de alimentos contaminados (Fatica & Schneider, 2011).

Los serotipos clasificados como iNTS son capaces de proliferar en el intestino, resistir variaciones de pH de 4 – 7, adherirse al epitelio intestinal por medio de fimbrias y adhesinas, y atravesar la membrana celular (Keestra-Gounder et al., 2015). Posteriormente, *Salmonella* se internaliza en una vacuola, evitando la destrucción por las lisozimas y llevando a cabo la replicación celular (Keestra-Gounder et al., 2015). Algunos investigadores han propuesto que esto ocurre en las células M del intestino permitiendo la internalización hacia los vasos linfáticos y sanguíneos, y subsecuente, invasión de órganos como el hígado y el bazo (Keestra-Gounder et al., 2015) (**Figura 5**).

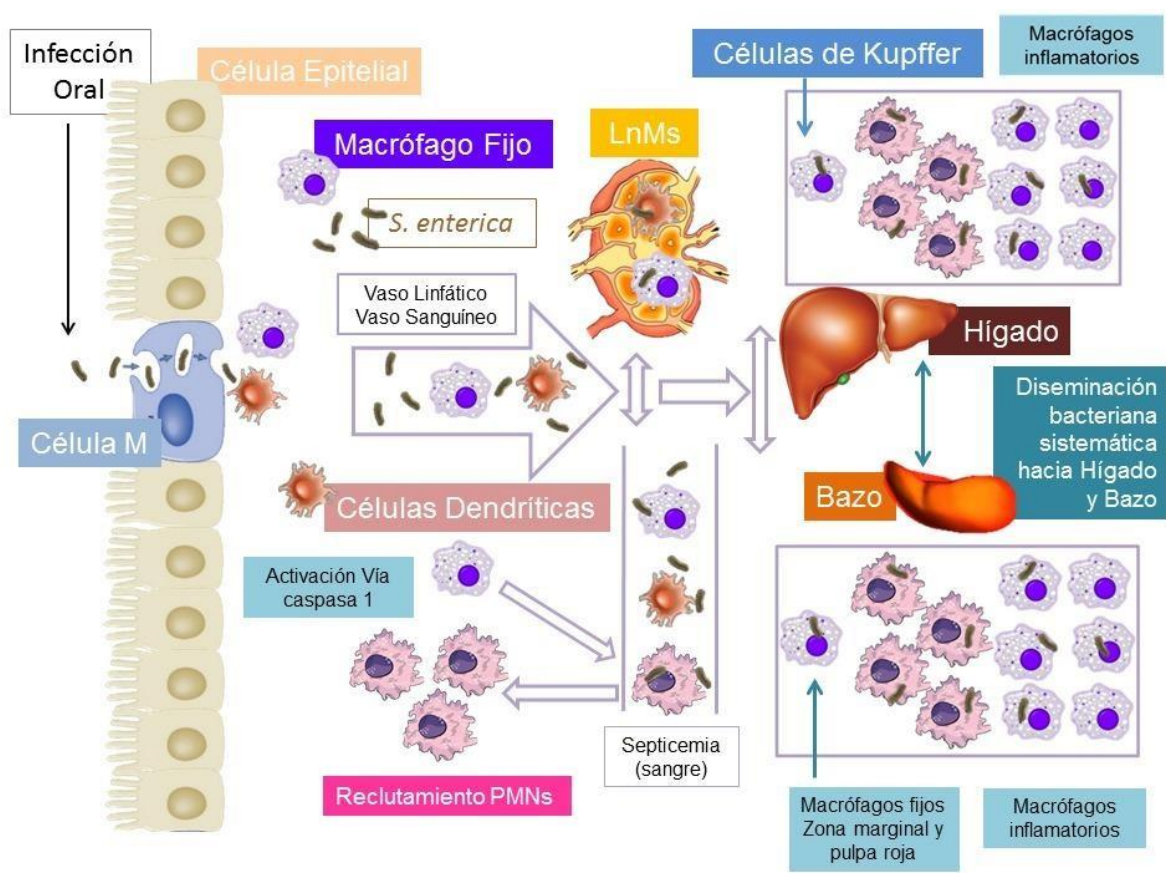


Figura 5: Diseminación sistémica de *S. enterica* (Adaptado de Silva & López, 2012).

Las infecciones sistémicas causadas por *S. enterica* pueden complicarse y causar la muerte del hospedador; por ejemplo, en EE.UU. se han reportado infecciones sistémicas en el 8% de los pacientes con salmonelosis (CDC, 2022). La capacidad de causar infecciones sistémicas se ha atribuido a la adquisición de plásmidos de virulencia (Frias, 2009).

2.5.1 Plásmidos de virulencia en *S. enterica* asociados a infecciones sistémicas

Se ha identificado plásmidos de virulencia denominados *Salmonella* plasmid virulence (*spv*), constituidos por 5 genes denominados R, A, B, C y D (Guiney & Fierer, 2011). El gen R es un promotor de la transcripción del complejo A, B, C, D. La proteína codificada por el gen A, es un promotor que permite el anclaje de la

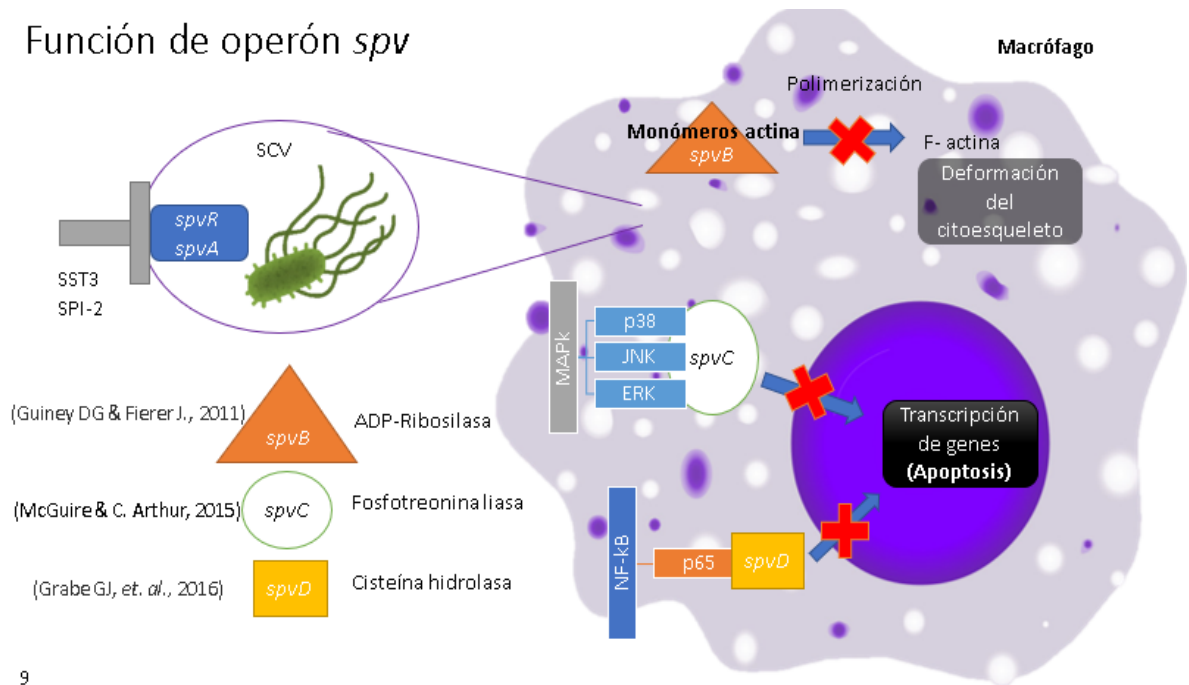
polimerasa, la proteína codificada por el gen B es una ribosil transferasa y su función es evitar la polimerización de la F- actina del citoesqueleto del huésped, promoviendo la sobrevivencia de la bacteria dentro de las células y de los macrófagos. El gen C codifica una proteína efectora que inactiva las quinasas activadas por mitógenos (MAPk); finalmente, el gen D codifica a una cisteína hidrolasa que afecta la respuesta del factor nuclear de las cadenas ligeras kappa en células B activadas (NF-KB) (**Tabla 3** y **Figura 6**) (Rolhion et al., 2016). Se ha demostrado que, causar infecciones sistémicas, *S. enterica* necesita al menos los genes R, B y C (Guiney & Fierer, 2011).

Tabla 3. Función de los genes presentes en el operón *spvRABCD*.

Gen:	Función:	Tamaño del gen	Tamaño de la proteína
<i>spvR</i>	Regulador positivo de transcripción	894 bp	297 aa
<i>spvA</i>	Secuencia promotora	768 bp	255 aa
<i>spvB</i>	ADP-ribosilasa	1776 bp	591 aa
<i>spvC</i>	Fosfotreonina liasa	726 bp	241 aa
<i>spvD</i>	Cisteína hidrolasa	651 bp	216 aa

(Guiney & Fierer, 2011)

Función de operón *spv*



9

Figura 6. Mecanismo del operón *spvRABCD*.

El *spvRABCD* es importante durante la colonización de *S. enterica* ya que influye en la invasión de las placas de Peyer, (pequeños nódulos linfáticos mesentéricos) y del bazo. Un estudio realizado con ratones reveló la presencia de estos plásmidos de virulencia están asociados a la capacidad de *S. enterica* para inhabilitar la respuesta de defensa por parte de los macrófagos (Guiney & Fierer, 2011). El *spvRABCD* se ha identificado en serotipos de *Salmonella*. Abortusis, Cholearasius, Dublin, Gallinarium, Paratyphi C, Sendai y Typhimurium (Feng et al., 2012).

2.5.2 Islas de la patogenicidad requeridas para la función de *spvRABCD*

Las proteínas efectoras, B, C, y D son inyectadas en el citoplasma a través de las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI-1 y 2) que facilitan la capacidad de invasión celular, resistencia a proteínas antimicrobianas y la sobrevivencia intracelular (Hapfelmeier et al., 2005). Diversos estudios han demostrado que el proceso de invasividad requiere la presencia de un repertorio genético amplio, que no necesariamente está asociado al aumento en su capacidad de replicación o de invasión intracelular

(Hume et al., 2017). Se ha demostrado que las SPI's (1-5, 9, 13 y 14) se encuentran conservadas en diferentes serovares no tifoideos (NTS) y poseen genes asociados al fenotipo invasivo en diferentes tejidos y órganos (**Tabla 4**) (Tran et al., 2010; Suez et al., 2013).

Tabla 4: Islas de patogenicidad de *S. enterica*.

SPI	Función	Referencia
1	Permite el SST3 para invasión epitelial	Hapfelmeier et al., 2005
2	Manipulación del tráfico vesicular y mejora la supervivencia intracelular en macrófagos	Hapfelmeier et al., 2005
3	Alberga <i>mgtC</i> , un gen específico de <i>Salmonella</i> que se requiere para la supervivencia intramacrófaga, la virulencia en ratones y el crecimiento en medios con bajo contenido de Mg ²⁺	Blanc-Potard et al., 1999
4	Sistema de secreción para toxinas	Wong et al., 1998
5	Proteínas efectoras como SopB del SST3 y PipB	Norris et al., 1998
7	Antígeno Vi, proteína efectora SopE, y el Pili IVB	Mirold et al., 1999
9	Codifica un SST1	Parkhill et al., 2001
13	Promueve la internalización de la bacteria en macrófagos y en organismos animales	Elder et al., 2018
14	Mediador en la invasión bacteriana al epitelio intestinal	Jiang et al., 2017

Adaptado de Balbuena-Alonso et al., 2020 (Tesis concluida).

2.6 *Drosophila melanogaster* como modelo para estudiar la interacción huésped-patógeno

Drosophila melanogaster, conocida como “mosca de la fruta” es un modelo biológico empleado recientemente para estudiar la relación huésped-patógeno. Entre las ventajas de emplear este modelo, destacan que posee un tiempo de vida relativamente corto (de 60 a 80 días); y que su genoma tiene un 60% de homología con el genoma de los mamíferos (Fortini et al., 2000). Es un modelo accesible, ya que requiere de poco espacio para su cultivo y mantenimiento, además del bajo costo para reproducir este modelo (Apidianakis & Rahme, 2011). Es considerado un buen modelo para el estudio de las interacciones huésped-patógeno; principalmente en el caso de infecciones intestinales, debido a que su sistema gastrointestinal tiene una alta similitud con los mamíferos (Apidianakis & Rahme, 2011) (**Figura 7**).

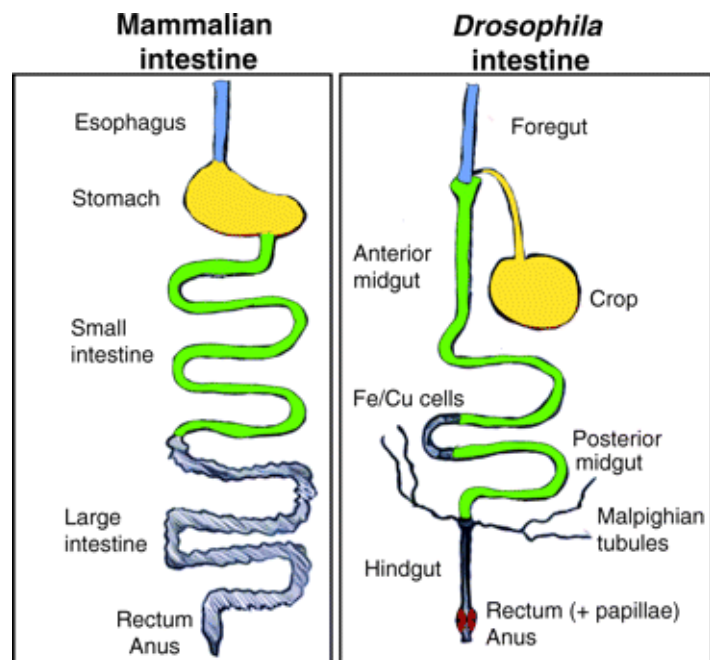


Figura 7. Esquema del tracto intestinal de mamíferos y de *D. melanogaster*. (Tomado de Apidianakis & Rahme, 2011)

Se ha demostrado que *D. melanogaster* contiene el 62% de los genes involucrados en enfermedades humanas, 72% de los genes asociados al desarrollo de cáncer,

64% de los genes asociados a enfermedades neurológicas, 65% de los genes asociados a síndromes de malformación, 82% de los genes asociados a enfermedades metabólicas, 69% de los genes asociados a enfermedades renales y 41% de los genes asociados a enfermedades del sistema inmune (Antonarakis & McKusick, 2000).

Interesantemente, patógenos que ocasionan enfermedades en humanos también generan pueden generar infecciones en *D. melanogaster* (Antonarakis & McKusick, 2000). Un estudio demostró que *D. melanogaster* responde a la presencia de microorganismos patógenos mediante la activación de la respuesta innata (Khush & Lemaitre 2000) y humoral, induciendo la secreción de péptidos antimicrobianos (Leclerc & Reichhart, 2004). Posteriormente, se activa una respuesta de melanización que expone a los patógenos al oxígeno reactivo a medida que la melanina se va depositando; y, por último, se activa la respuesta inmune celular, que puede provocar la fagocitosis de los microorganismos (Kim-Jo et al., 2019).

Lee, y colaboradores, en 2012, demostraron que la proteína de reconocimiento del peptidoglicano bacteriano (PGLYRP2) inhibe la adherencia de las bacterias a la mucosa intestinal de *D. melanogaster* (Lee et al., 2012). También se han identificado enzimas como la Dmp38p (homólogo de la familia p38), necesarias para desencadenar mecanismos de encapsulación fagocítica de *S. Typhimurium* en los hemocitos de *Drosophila* (Shinzawa et al., 2009).

Por otra parte, un estudio demostró que la delección del gen *imd*, asociado a deficiencia inmune, disminuye el porcentaje de sobrevivencia (hasta 45%) de *D. melanogaster* (Brandt et al., 2004). Estos datos sugieren la vía de señalización de *imd* está asociada a la respuesta inmune contra bacterias Gram-negativas como *S. enterica* (Brandt et al., 2004).

En conjunto, estos estudios respaldan el uso de modelos biológicos como *D.*

melanogaster como una alternativa accesible para estudios de interacción huésped-patógeno. Específicamente, este modelo permitirá realizar ensayos de tamizaje de amplias colecciones de aislamientos de bacterias enteropatógenas como *S. enterica*.

El presente trabajo pretende obtener la distribución del operón *spvRABCD*, en las diferentes bases de datos genómicas de *Salmonella*. Generar un ensayo molecular de detección del operón en productos cárnicos avícolas y realizar una prueba de desafío en *D. melanogaster*.

3. JUSTIFICACIÓN

El surgimiento de cepas de *S. enterica* con capacidad de causar infecciones sistémicas, que provocan la invasión de diferentes órganos y tejidos, es un grave problema de salud pública a nivel mundial. Diversos estudios de genómica comparativa han identificado genes específicos involucrados en el proceso de invasividad de *S. enterica*. Sin embargo, se desconoce si este repertorio genético está presente en cepas de *S. enterica* aisladas de alimentos y cuál es su contribución en el desarrollo de infecciones sistémicas en humanos.

En este contexto, los altos niveles de *S. enterica* aislada de productos cárnicos avícolas, se consideran una fuente potencial de este patógeno para los consumidores. Por lo tanto, es fundamental estudiar la contribución del repertorio genético de estos aislamientos en los procesos de invasión y en el desarrollo de infecciones sistémicas. Para este fin, se ha documentado ampliamente el uso de modelos biológicos accesibles que permiten estudiar la interacción huésped – patógeno. Específicamente, el modelo de infección con *D. melanogaster* ha demostrado ser una herramienta efectiva para estudiar la patogenicidad e invasión de *S. enterica*, debido a sus cortos periodos de generación, facilidad para aumentar el número de organismos en el diseño experimental y la disponibilidad de información genética para el análisis de la respuesta molecular en procesos de invasión por bacterias patógenas.

Por estas razones, es necesario identificar el repertorio genético de *S. enterica* que le confiere la capacidad de invasión a tejidos y órganos. Esta información se debe evaluar en un modelo de infección como *D. melanogaster*, que permita identificar el potencial de virulencia de los aislamientos de *S. enterica* prevalentes en productos cárnicos avícolas.

4. OBJETIVOS.

4.1 General.

Identificar la prevalencia y diversidad de genes asociados a infecciones sistémicas en aislamientos de *S. enterica* recuperados a partir de productos cárnicos avícolas, y evaluar su potencial invasivo en un modelo de infección con *D. melanogaster*.

4.2 Específicos.

1. Identificar a través de estudios genómicos comparativos la diversidad de genes asociados a infecciones sistémicas en genomas de *S. enterica*.
2. Desarrollar un ensayo molecular de tamizaje para evaluar la prevalencia y diversidad de genes asociados a infecciones sistémicas en *S. enterica* aislada de carne de pollo durante el Sistema de Vigilancia Permanente.
3. Identificar la contribución de los genes de virulencia en la colonización, morbilidad y mortalidad de *D. melanogaster*.

5. METODOLOGÍA.

5.1 Identificación de genes asociados a infecciones sistémicas mediante métodos bioinformáticos

Se realizó una búsqueda exhaustiva de la literatura para identificar genes en *S. enterica* asociados a infecciones sistémicas en aves, animales y humanos (Derakhshandeh & Khoshbakht, 2013). Este análisis reveló que la presencia del operón *spvRABCD* en diferentes serotipos de *S. enterica* es un factor de virulencia asociado a invasividad e infecciones sistémicas en aves y mamíferos (**Tabla 5**).

Tabla 5: Distribución del operón *spvRABCD* en diferentes huéspedes.

Fuente	Serotipos	Genes	Referencia
Carne de pollo	<i>S. Enteritidis</i>	RABCD	(Derakhshandeh & Khoshbakht, 2013)
	<i>S. Typhimurium</i>	RABCD	
	<i>S. Infantis</i>	RABCD	(Kennedy et al. 2020)
	<i>S. Colindal</i>	RABCD	
Animales	<i>S. Abortusovis</i>	RABCD	(Alzwghaibi et al., 2018)
	<i>S. Enteritidis</i>	RABCD	
	<i>S. Typhimurium</i>	RABCD	(Rizwana, Gulig & Parveen, 2019)
	<i>S. Virchow</i>	RABCD	
Humanos	<i>S. Enteritidis</i>	RABCD	(Madajczak & Binek, 2005).
	<i>S. Bardo</i>	RABCD	

Las secuencias de referencia del operón *spvRABCD* fueron obtenidas de la base de datos Uniprot (www.uniprot.org). Para identificar la diversidad del *spvRABCD* en los diferentes serotipos de *Salmonella* se realizó una búsqueda de estas proteínas en genomas (n = 12,500) y plásmidos (n = 1125) de *S. enterica* con la herramienta BLAST (Madden, 2002) del National Center of Biotechnology Information (NCBI). Se obtuvieron las secuencias homologas con un porcentaje de identidad y cobertura >92% (**Tabla 6**). Una vez identificadas las proteínas se obtuvieron las secuencias de nucleótidos para el análisis de cobertura de los iniciadores de qPCR.

Tabla 6: Parámetros de diversidad de secuencias del operón *spvRABCD* en plásmidos y genomas.

Gen:	# acceso Uniprot:	% ID y cov
<i>spvR</i>	PSLT041	92-100
<i>spvA</i>	PSLT040	
<i>spvB</i>	PSLT039	
<i>spvC</i>	PSLT038	
<i>spvD</i>	PSLT037	

5.2 Análisis de especificidad y cobertura de iniciadores de qPCR

Mediante una búsqueda en la literatura se identificaron los pares iniciadores que se utilizaron en las reacciones de qPCR, se tienen reportados varios pares de iniciadores con el objetivo de analizar la prevalencia de este operón. Se realizó un análisis bioinformático para determinar la cobertura y la especificidad de los diferentes iniciadores de qPCR en la base de datos de alelos de cada uno de los genes del operon *spvRABCD*. Para este fin se utilizó el software MEGAX (Kumar et al., 2018), para alinear las secuencias de los alelos e identificar la secuencia de los iniciadores sentido y anti-sentido. Las bases de cada iniciador que no coincidían fueron modificadas por ambigüedades utilizando el código de nucleótidos estandarizado por la IUPAC (PAC, 1995).

Los iniciadores reportados en la literatura para el gen *spvD* no presentaron homología de nucleótidos con las secuencias de la base de datos de alelos. Por lo tanto, se diseñaron 2 pares nuevos de iniciadores utilizando la herramienta PrimerQuestTool disponible en Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Results>) (**Tabla 7**).

Tabla 7: Iniciadores reportados para qPCR.

Gen	Nombre		Secuencia (5´-3´)	Referencia
<i>spvR</i>	spvRf	F	CMGGTTCCTTCAGTATCGCA	Pasmans F et al., 2003
	spvRr	R	TYTGGCCGGAAATGKTCAGT	
<i>spvA</i>	spvA-F	F	GTCAGACCCGTAAACAGT	Gebreyes et al., 2009
	spvA-R	R	GCACGCAGAGTACCCGCA	
<i>spvB</i>	spvB-F	F	CGCAGTATAACGACAGCG AT	Pasmans F et al., 2003
	spvB-R	R	GCTAGTCCAGAGGTACAG AT	
<i>spvC</i>	spvCF	F	TGGGGCGGAAATACC ATC	Mohamed et al., 2014
	spvCR	R	GAACTGAGCGCCCA SGCTMAS AC	
<i>spvD</i>	spvD1	F	AGTTTCTGGTAGTGCGTCATC	Presente estudio
	spvD2	R	CAACAATGGYKCTGTCTAATC	

5.3 Estandarización de la qPCR para detectar el operón *spvRABCD*

Se realizaron gradientes de la temperatura de alineación para identificar los parámetros que generaran los mejores (intensidad de las bandas y tamaño esperado del amplicón) productos de la qPCR. Los gradientes se realizaron con temperaturas de alineación de 65° C, 64.5° C, 63.3° C, 61.4° C, 59° C, 57° C, 55.7° C, y 55° C por 1 minuto, utilizando una temperatura de desnaturalización de 94° C por 1 minuto, y de extensión de 72° C por 1 minuto. Basado en las características de los amplicones de cada uno de los genes del *spvRABCD* se seleccionó la temperatura de 61.4° C como temperatura ideal para la amplificación de todos los genes. Esta temperatura de alineación se utilizó en el protocolo final de qPCR (Tabla 8).

Tabla 8: Protocolo de qPCR para detección de *spvRABCD*.

Protocolo qPCR de <i>spvRABCD</i>	
94°C x 3 min.	
94° C x 1 min.	
61.4° C x 1 min.	X 35 ciclos
72° C x 1 min.	
72° C x 3 min.	
12° C x ∞	

Estos ensayos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de PCR tiempo real CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad), donde se identificaron la especificidad de la amplificación utilizando las curvas de disociación y utilizando un valor de corte de CT = 30 (**Tabla 9 y Figura 8**).

Tabla 9: Parámetros de amplificación para operón *spvRABCD*.

Temperatura	Gen	CT value	T° de disociación
61.4 ° C	<i>spvR</i>	30	81.5
	<i>spvA</i>	30	88.5-89
	<i>spvB</i>	30	89.5
	<i>spvC</i>	30	85
	<i>spvD</i>	30	79

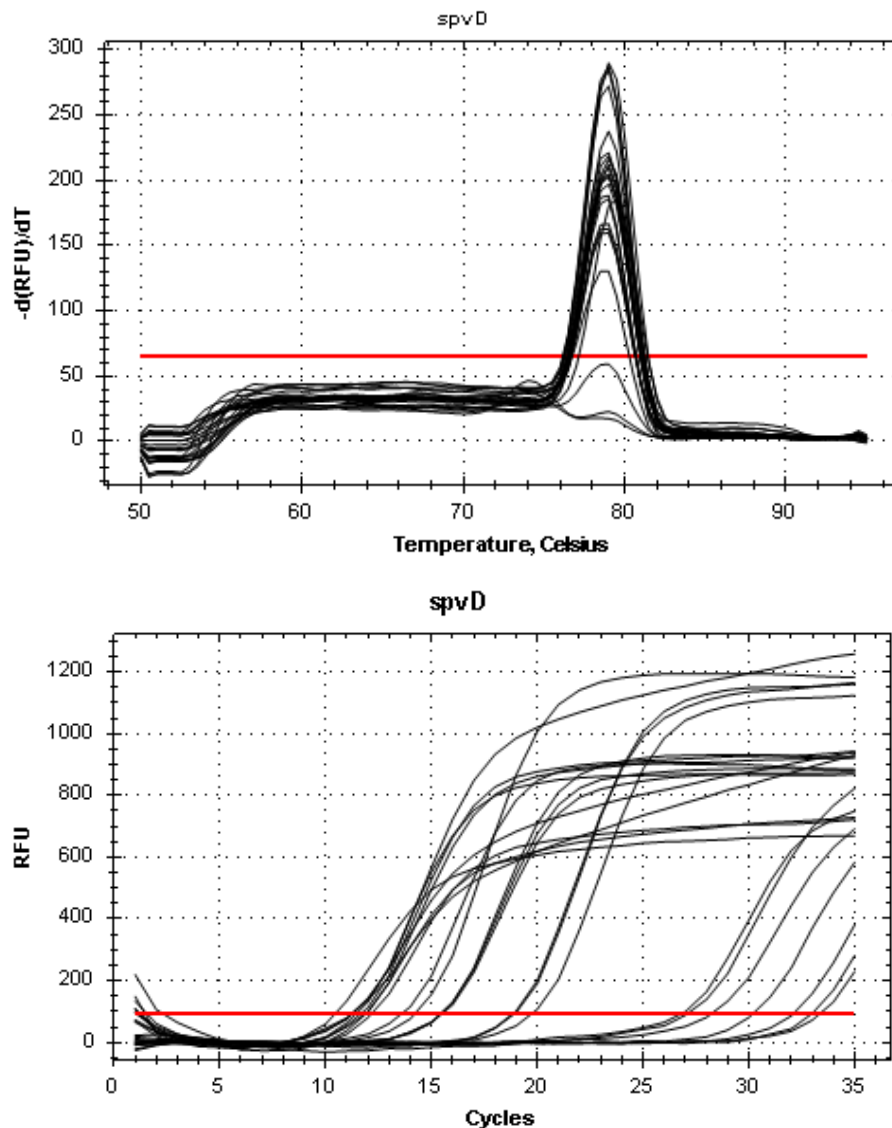


Figura 8: Gráficas presentadas por el equipo CTX1000 Real Time qPCR. La primera grafica nos presenta las temperaturas de disociación y la segunda el CT value.

5.3.1 Cepas utilizadas en el estudio y extracción de ADN

Los aislamientos utilizados en el estudio se obtuvieron a partir del Cepario del laboratorio de Microbiología Molecular de la UAQ, responsable del Sistema de Vigilancia Permanente de *Salmonella*. Los detalles de la colección de las muestras y análisis microbiológicos fueron publicados por Regalado y colaboradores (Regalado-Pineda et al., 2020). Los aislamientos obtenidos durante los meses de

enero a diciembre de 2016 (n = 89) fueron utilizados en el presente trabajo. Estos aislamientos se sometieron al proceso de extracción de ADN mediante el kit de extracción Quick-DNA Miniprep (Zymo Research) de acuerdo con las condiciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN se llevó a cabo con un sistema Nanodrop 2000 (Thermoscientific). Para los ensayos de qPCR el ADN se estandarizó a una concentración de 5 ng/ μ L.

5.3.2 Identificación de genes asociados a invasividad mediante ensayos de qPCR

Con el objetivo de identificar la presencia de los genes del operón *spvRABCD* de *S. enterica*, se llevaron a cabo ensayos de qPCR con la enzima Takara *Ex Taq HS*, siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 10**. Estas reacciones se llevaron a cabo en un equipo CFX Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

Tabla 10: Protocolo de reacciones de qPCR para la detección de *spvRABCD*.

Reactivo	μ L
SYBR Green (TaKaRa)	5
Primer F	0.68
Primer R	0.68
BSA	0.85
DNA	2
H ₂ O	0.79
Total	10

5.4 Cultivo y mantenimiento de *D. melanogaster*

En estudios previos realizados en el grupo de trabajo, se estandarizaron las condiciones de cultivo y mantenimiento de *D. melanogaster* cepa Oregon (cepa silvestre). La replicación de *D. melanogaster* se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Tzou et al., 2002 y Diaz-Peña et al., 2019. Las moscas se mantuvieron con un régimen de luz y oscuridad de 12:12, con una humedad relativa del 50%. La anestesia de las moscas se llevó a cabo por descenso de la temperatura colocando hielo debajo de cajas Petri por 5 min aproximadamente.

5.4.1 Elaboración del alimento para *D. melanogaster*

El alimento de *D. melanogaster* se elaboró con 100 g de harina de maíz, 52.5 g de dextrosa, 26.2 g de sacarosa y 6 g de agar bacteriológico II en 720 ml de agua destilada; una vez mezclados los ingredientes, el alimento se sometió a esterilización por 15 min a 121°C. Posteriormente, se agregaron 5 ml de ácido propiónico y 9.7 g de grenetina comercial disuelta en 100 ml de agua previamente estériles. La mezcla se distribuyó en tubos de 10 ml y en matraces de 40 ml. Todos los tubos que contenían el alimento se taparon con torundas de algodón estériles y se almacenaron a 4 °C.

5.4.2 Preparación del inóculo

Los aislamientos de *Salmonella* se obtuvieron del cepario (-20° C), y se activaron en CST a 37° C/24 h. Pasado el periodo de incubación las células se lavaron a través de un proceso de centrifugación y reconstitución en Solución Salina Fisiológica 0.9% NaCl (SSF); siguiendo la metodología reportada por (Kutzer et al., 2019). Una vez finalizado este procedimiento, el inóculo se estandarizó a una concentración aproximada de 1×10^8 CFU/ml (0.125 A, a 600 nm) utilizando un espectrofotómetro (Varioskan Flash Photometric 550). La preparación del inóculo se realizó de acuerdo a la metodología reportada por (Stevanovic et al., 2015) (**Tabla 11**). De esta solución se colocaron 50 µl del inóculo preparado en un círculo de 2 cm de diámetro de papel filtro #1 (Whatman). Cada círculo de papel filtro contenía aproximadamente 1.2×10^6 células de *S. enterica*.

Tabla 11: Formulación del inóculo.

Inóculo	µl
Bacteria	180
Agua	60
Colorante 1% (Azul brillante)	10
Volumen total	250

5.4.3 Procedimiento de infección de *D. melanogaster*

Para el proceso de infección oral se utilizaron 5 cepas de *S. enterica* que incluían aislamientos con el operón completo, parcial y ausente (**Tabla 12**). El protocolo de infección oral se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Ferreira et al., (2014). Las moscas fueron sometidas a 2 horas ayuno y posteriormente colocadas, 2 horas, en los tubos con papel filtro para que consumieran el inóculo bacteriano. Después del proceso de infección oral se realizó el conteo y la selección de *D. melanogaster* con el vientre azul, indicador del consumo del inóculo. Para cada aislamiento de *S. enterica* se utilizaron 40 moscas y los ensayos de desafío se realizaron seis replicas.

Tabla 12: Códigos empleados en el desafío de *Salmonella* con *D. melanogaster*.

Aislamientos	Operón <i>spv</i>	Código
T707.1	<i>RB</i>	<i>Salmonella RB</i>
T708.1	<i>RABCD</i>	<i>Salmonella RABCD</i>
T817.1	<i>RBCD</i>	<i>Salmonella RBCD</i>
79.1	Sin operón	<i>Salmonella sin operón</i>
C -	-----	<i>No desafiado</i>

5.4.4 Análisis de la replicación y supervivencia de *S. enterica* en *D. melanogaster*

Para el análisis de replicación de *S. enterica* en las moscas, se colectaron 3 moscas a los días 0, 2, 4 y 8 post-infección, se lavaron con 500 µl de etanol al 96% y posteriormente con 500 µl de agua destilada estéril con la finalidad de eliminar la carga bacteriana externa; posteriormente las moscas se colocaron en tubos de 1.5 ml y se homogeneizaron con 200 µl de SSF estéril. Se realizaron diluciones decuples seriadas y se sembraron en agar XLD (xilosa lisina deoxicolato) siguiendo el método de microgotas en placa (Siva-Jothy et al., 2018). El conteo de CFU se realizó 24 horas post-inoculación a 37° C. La mortalidad se cuantificó y registró del

día 0 al 8 post-infección.

5.5 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como las medias \pm el error estándar (SE). Los análisis de varianza y los análisis de comparaciones múltiples de medias, fueron realizados usando el paquete estadístico el paquete estadístico Statview versión 10. Las medias se compararán utilizando la prueba de Fisher ($P > 0.05$).

6. Resultados y discusión

6.1 Distribución del operón *spvRABCD* en genomas y plásmidos de *S. enterica*

El análisis bioinformático del operon *spvRABCD* reveló la presencia de al menos 220 secuencias en los genomas de *S. enterica* y en al menos 165 secuencias en plásmidos (**Tabla 13**). La presencia de los genes del operón *spvRABCD* se evidenció en 15 serotipos de *Salmonella* (**Figura 10 y 11**); indicando una distribución más amplia de lo previamente reportado (Guiney & Fierer, 2011). También, en el presente trabajo, se identificaron 24 alelos del gen R, 14 alelos del gen A, 33 alelos del gen B, 17 alelos del gen C, y finalmente 27 alelos del gen D.

Tabla 13: Total de secuencias obtenidas del operón *spvRABCD* en genomas y plásmidos de *S. enterica*.

% ID	%COV	Gen	Secuencias en genomas	Secuencias en plásmidos
92-100	92-100	<i>spvR</i>	227	165
		<i>spvA</i>	222	170
		<i>spvB</i>	220	191
		<i>spvC</i>	223	173
		<i>spvD</i>	224	171

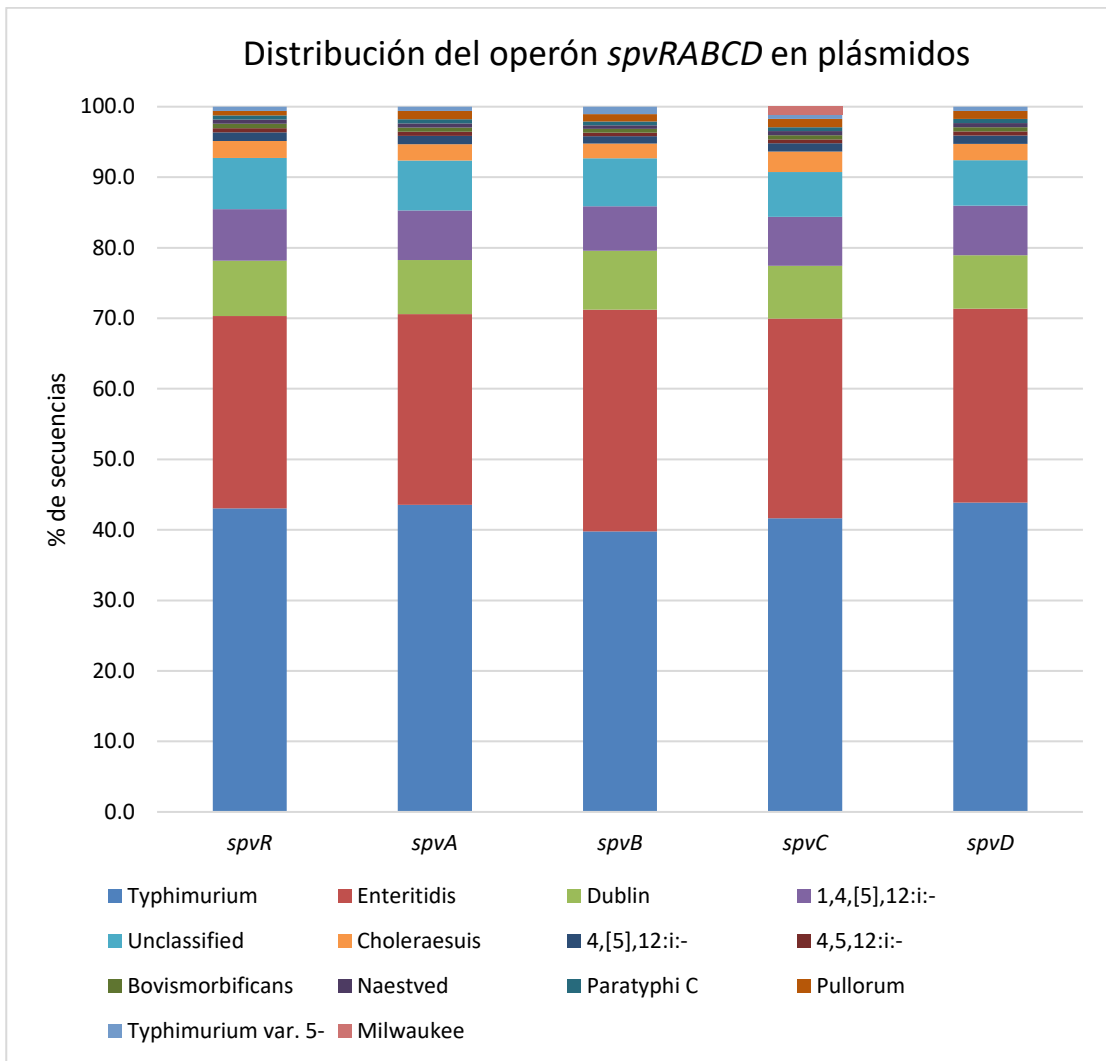


Figura 9: Distribución de serotipos del operón *spvRABCD* en plásmidos.

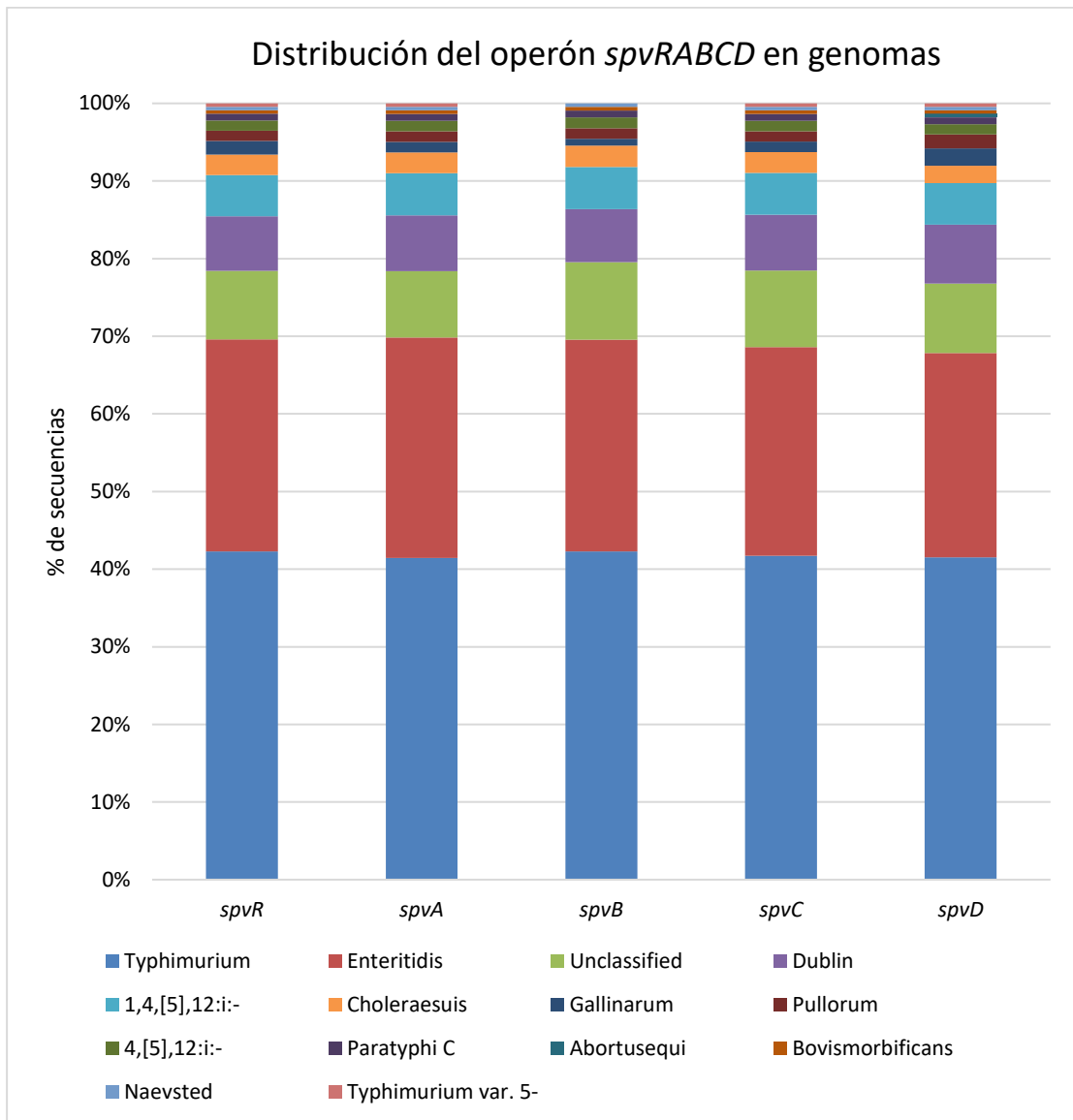


Figura 10: Distribución de serotipos del operón *spvRABCD* en genomas.

6.2 Ensayo molecular de detección del operón *spvRABCD* en aislamientos de *S. enterica* provenientes de carne de pollo

Para determinar la prevalencia del operón *spvRABCD* se analizaron 89 aislamientos obtenidos a partir de pierna y muslo de pollo (64 de supermercados y 25 de mercados públicos). Estos aislamientos corresponden al análisis realizado de enero a diciembre del 2016. La prevalencia de los genes del operón *spvRABCD*, a lo largo del año fue de 95.5%, 74.2%, 93.2%, 87.7%, y 92.1% respectivamente (**Tabla 14**).

Tabla 14: Prevalencia del operón *spvRABCD* dentro de los aislamientos de carne de pollo (2016).

Mes	# de aislamientos	<i>spvR</i> (%)	<i>spvA</i> (%)	<i>spvB</i> (%)	<i>spvC</i> (%)	<i>spvD</i> (%)
Enero	9	88.9	66.7	77.8	66.7	77.8
Febrero	12	100.0	91.7	100.0	100.0	100.0
Marzo	5	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Abril	14	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Mayo	9	88.9	77.8	88.9	100.0	100.0
Junio	12	100.0	75.0	100.0	83.3	75.0
Julio	9	100.0	77.8	100.0	88.9	100.0
Agosto	6	100.0	0.0	100.0	83.3	100.0
Septiembre	2	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Octubre	5	100.0	60.0	100.0	100.0	100.0
Noviembre	1	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
Diciembre	5	60.0	40.0	40.0	40.0	60.0
TOTAL	89	95.5	74.2	93.4	87.7	92.1

La alta prevalencia de los genes del operón *spvRABCD* también se ha reportado en otras regiones del mundo. Por ejemplo, un estudio en España, realizado entre 2011 y 2015, con 6,577 aislamientos provenientes de carne de pollo, reveló una prevalencia del 50.7% para el gen *spvB* de y del 44.8% para el gen *spvC* (Lamas et

al., 2016). En India, un estudio con 655 aislamientos obtenidos a partir de muestras de pechuga de pollo, reveló una prevalencia de 77.3% y 22.7% para los genes *spvR* y *spvC*, respectivamente (Shivaning et al., 2020). Un estudio realizado en Brasil donde 40 aislamientos de *S. Typhimurium*, reveló la presencia del operón *spvRABCD* completo, en el 55% de los aislamientos (Seribelli et al., 2020). Este último estudio y el presente trabajo, son las primeras evidencias del análisis del operón completo.

En el presente estudio, también se reveló la presencia de los genes del operón *spvRABCD*, en los aislamientos, obtenidos a partir de carne de pollo, de los serotipos Agona, Anatum, Bareilly, Bredeney, Choleraesuis, Enteritidis, Heidelberg, Infantis, Kentucky, Mbandaka, Meunchen, Newport, Oranienburg, Ouakam, Panama, Senftenberg y Typhimurium (**Tabla 15**). Esta amplia distribución del operón *spvRABCD* en diferentes serotipos de *S. enterica* también se ha evidenciado en otros países como Shanghái, Brasil, e Irán donde se ha evidenciado la presencia de los genes del operón *spvRABCD* en los serotipos Anatum, Enteritidis, Infantis, Kentucky, London, Montevideo, Newport, Senftenberg y Typhimurium (Rizwana, Gulig & Parveen, 2019; Yang et al., 2018; Derakhshandeh, Firouzi & Khoshbakht, 2013). En conjunto estos resultados sugieren que el operón *spvRABCD* tiene una amplia distribución en los diferentes serotipos de *S. enterica*.

Tabla 15: Distribución y prevalencia del operón *spvRABCD* en serotipos de *S. enterica*, 2016.

Serotipo	# de aislamientos	<i>spvR</i> (%)	<i>spvA</i> (%)	<i>spvB</i> (%)	<i>spvC</i> (%)	<i>spvD</i> (%)
Agona	1	100	0	0	0	0
Anatum	5	100	60	100	80	100
Bareilly	1	100	100	100	100	100
Bredeney	1	100	0	100	100	100
Choleraesuis	1	100	0	100	100	0
Enteritidis	51	96	100	100	100	100
Heidelberg	1	100	100	100	100	100
Infantis	31	42	13	35	22	29
Kentucky	2	50	0	0	0	0
Mbandaka	1	100	100	100	100	100
Meunchen	1	100	0	100	0	0
NR	4	100	75	100	75	100
Newport	3	67	0	34	34	100
Oranienburg	1	100	0	100	0	100
Ouakam	1	100	0	100	100	100
Panama	2	100	100	100	100	100
Senftenberg	3	100	0	100	100	100
Typhimurium	5	80	40	80	80	80

Nota: NR es serotipo no registrado.

6.3 Desafío de *D. melanogaster* vs. operón *spvRABCD*

En el presente trabajo, se observó que el serotipo *Infantis* presenta diferentes combinaciones de los genes pertenecientes al operón *spvRABCD*. Se identificaron aislamientos del serotipo *Infantis* con los 5 genes (13% de aislamientos), 4 genes (6.5% de los aislamientos), 2 genes (9.7% de los aislamientos) y sin operón (61.6% de los aislamientos). Además, en numerosas regiones del mundo, el serotipo *Infantis*, se ha convertido en uno de los serotipos más prevalentes en la industria cárnica avícola y porcina; y una de las principales causas de infecciones sistémicas y multirresistentes a antibióticos (Miller et al., 2010; Tyson et al., 2021; Marder et al., 2018). Basado en esta información, se seleccionaron 4 cepas de *S. Infantis* para

evaluar el efecto del operón completo e incompleto sobre la replicación de *Salmonella* y la mortalidad en el modelo *D. melanogaster*.

Las moscas desafiadas con *S. infantis* conteniendo el operón completo, tuvieron una mayor replicación ($P \leq 0.05$) del patógeno a los días 2, 4 y 8 post-infección, comparado con las cepas que poseían el operón parcial o sin operón (**Figura 11**). Estos resultados resaltan la importancia del modelo *D. melanogaster* para llevar a cabo estudios de virulencia con *S. enterica*; esta idea ha sido promovida por otros trabajos previamente publicados (Ayres & Schneider, 2008; Brandt et al., 2004). Además, el presente estudio también revela que la presencia del operón *spvRABCD* permite una mayor replicación dentro del hospedero.

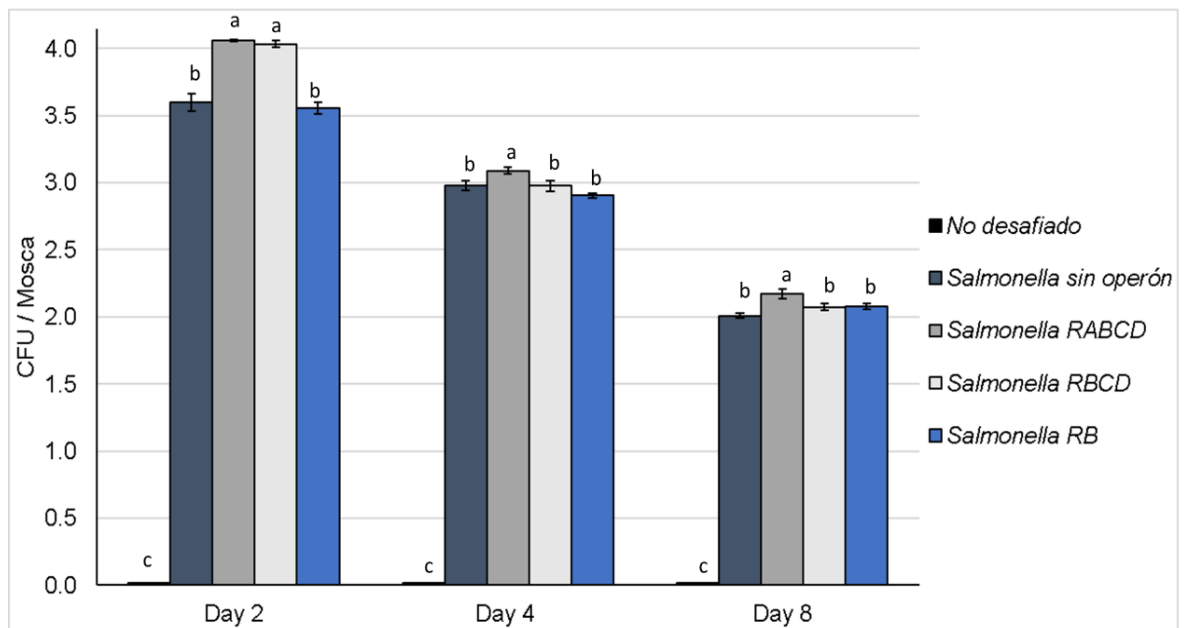


Figura 11. Replicación de *Salmonella* en *D. melanogaster*.

Los estudios de supervivencia revelaron que los desafíos con *S. Infantis* que poseen el operón con 5 y 4 genes del operón *spvRABCD*, causan mayor mortalidad ($P \leq 0.05$) comparado con el operón conteniendo 2 y 0 genes. Específicamente el desafío con *S. Infantis spvRABCD*, causa mayor mortalidad ($P \leq 0.05$) del día 5, 7 y 8 post-infección; mientras que el desafío con *S. Infantis spvRBCD*, causó mayor mortalidad ($P \leq 0.05$) en el día 8 comparado con *S. Infantis* sin operón. En promedio, el desafío con *S. Infantis spvRABCD*, causó 5.4% mayor mortalidad que *S. Infantis* sin operón (**Figura 12**). En conjunto, los resultados de replicación y el porcentaje de mortalidad causado por la infección de *Salmonella* indican que la presencia del operón *spvRABCD* puede ser un factor que aumenta la virulencia de *Salmonella*.

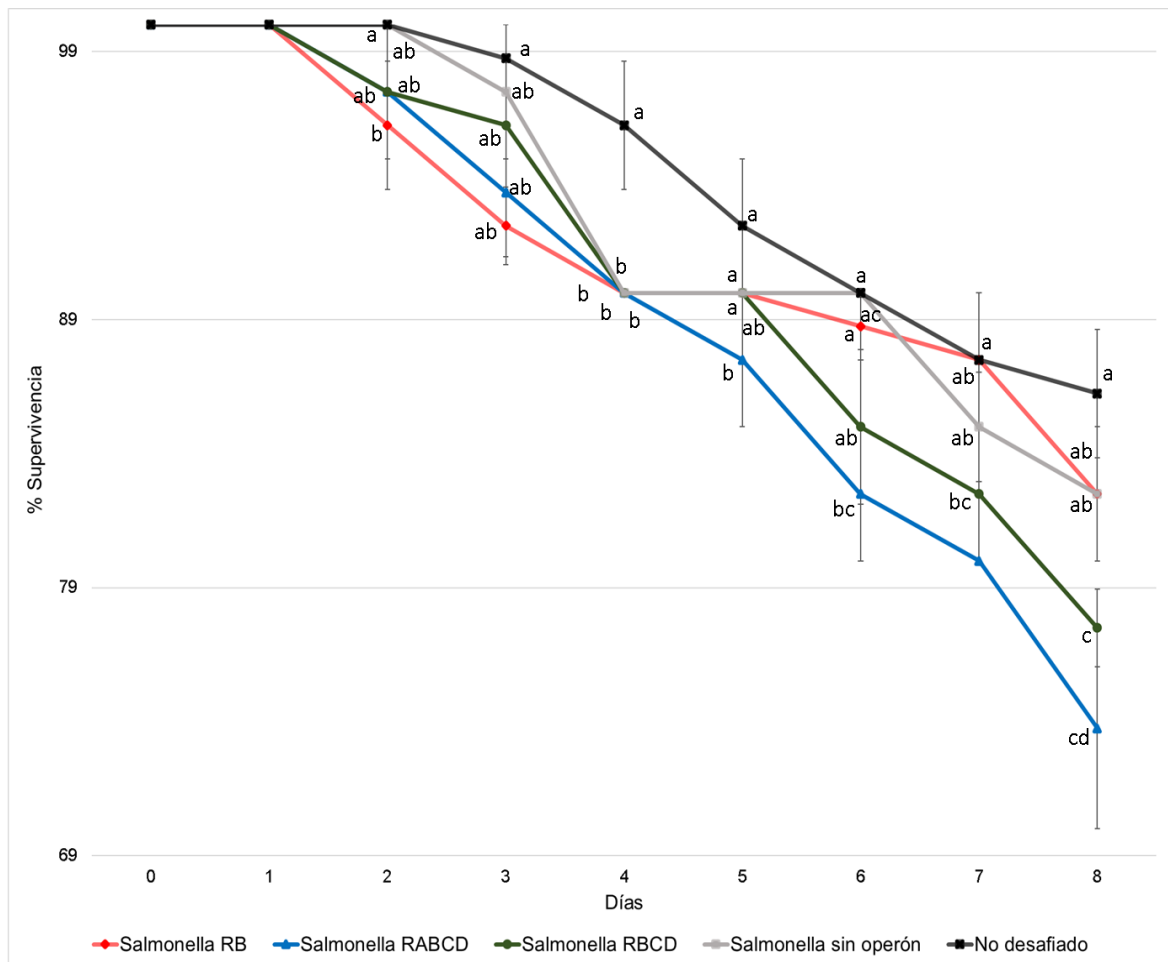


Figura 12. Supervivencia de *D. melanogaster* vs. *Salmonella*.

7. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se evidenció que la distribución del operón *spvRABCD* es más amplia de lo previamente establecido. Específicamente, se presenta evidencia indicando que este factor de virulencia ha sido adquirido por los serotipos Abortusequi, Agona, Anatum, Bareilly, Bovismorbificans, Bredeney, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum, Heidelberg, Infantis, Kentucky, London, Mbandaka, Meunchen, Milwaukee, Montevideo, Naevsted, Newport, Oranienburg, Ouakam, Panama, Paratyphi C, Pullorum, Sendai, Senftenberg y Typhimurium.

Adicionalmente, en el presente trabajo se presenta evidencia de la capacidad de aumentar la colonización, morbilidad y mortalidad de *S. enterica*, indicando que la presencia del operón *spvRABCD* favorece la replicación de *S. enterica* en el modelo *D. melanogaster*. En particular los aislamientos con los 5 genes tienen un potencial de virulencia mayor que los aislamientos que poseen 4, 2 y 0 genes.

Finalmente, este trabajo revela que los aislamientos de *S. enterica* que circulan en la industria cárnica avícola de la zona del bajío de México tienen un elevado potencial de virulencia. Una problemática que enfrenta el sector avícola a nivel mundial.

8. REFERENCIAS

- Alzwghaibi, A. B., Yahyaraeyat, R., Fasaei, B. N., Langeroudi, A. G., & Salehi, T. Z. (2018). Rapid molecular identification and differentiation of

common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. *Archives of microbiology*, 200(7), 1009–1016. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1501-7>

- Angelotti, R., Foter, M. J., & Lewis, K. H. (1961). Time-Temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods: II. Thermal Death Time Studies. *Applied Microbiology*, 9(4), 308-315.
- Antonarakis, S. E., & McKusick, V. A. (2000). OMIM passes the 1,000-disease-gene mark. *Nature genetics*, 25(1), 11-11.
- Apidianakis, Y., & Rahme, L. G. (2011). *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Disease models & mechanisms*, 4(1), 21– 30. <https://doi.org/10.1242/dmm.003970>
- Ayres, J. S., & Schneider, D. S. (2008). A signaling protease required for melanization in *Drosophila* affects resistance and tolerance of infections. *PLoS biology*, 6(12), 2764–2773. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060305>
- Balbuena-Alonso M., Nava-Morales G. (2020) Repertorios genéticos de virulencia y multiresistencia a antibióticos de *Salmonella enterica* prevalente en carne de pollo (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro.
- Bahramianfard, H., Derakhshandeh, A., Naziri, Z., & Khaltabadi Farahani, R. (2021). Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella* Enteritidis from poultry and egg samples in Iran. *BMC veterinary research*, 17(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02900-2>
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., & Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*, 181(3), 998– 1004.
- Blaser, M. J., & Newman, L. S. (1982). A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Reviews of infectious diseases*, 4(6), 1096–1106.

<https://doi.org/10.1093/clinids/4.6.1096>

- Boring, J. R., Martin, W. T., & Elliott, L. M. (1971). Isolation of *Salmonella typhi*-murium from municipal water, Riverside, California, 1965. *American journal of epidemiology*, 93(1), 49–54. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121227>
- Brandt SM, Dionne MS, Khush RS, Pham LN, Vigdal TJ, Schneider DS (2004) Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in a *Salmonella*-Infected Fruit Fly. *PLoS Biol* 2(12): e418. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020418>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella* Surveillance Overview. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2022. (Accessed 09/05/2020)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Foodborne outbreak online database. US Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, <http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks> (accessed 09 May 2020).
- Center for Disease Control and Prevention. (2019). Information for Healthcare Professionals and Laboratories. 2020, abril 28, de *Salmonella* Homepage Recuperado de <https://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>
- Center of Disease Control and Prevention. (2020). *Salmonella* and Chicken. 2022, mayo 23, de Center of Disease Control and Prevention Recuperado de <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/prevention-priorities/salmonella-and-chicken.html>
- Cheng, R. A., Eade, C. R., & Wiedmann, M. (2019). Embracing Diversity: Differences in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to the Success of Nontyphoidal *Salmonella* as a Foodborne Pathogen. *Frontiers in microbiology*, 10, 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., & Khoshbakht, R. (2013). Association of

Three Plasmid-Encoded *spv* Genes Among Different *Salmonella* Serotypes Isolated from Different Origins. *Indian journal of microbiology*, 53(1), 106–110. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0316-5>

- 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>
- Dougan, G., & Baker, S. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annual review of microbiology*, 68, 317–336. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091313-103739>
- Elder, J. R., Paul, N. C., Burin, R., Guard, J., & Shah, D. H. (2018). Genomic organization and role of SPI-13 in nutritional fitness of *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*. doi: [10.1016/j.ijmm.2018.10.00](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.00)
- Fatica, M. K., & Schneider, K. R. (2011). *Salmonella* and produce: survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence*, 2(6), 573–579. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17880>
- EVANS, M., SALMON, R., NEHAUL, L., MABLY, S., WAFFORD, L., NOLAN-FARRELL, M., . . . RIBEIRO, C. (1999). An outbreak of *Salmonella typhimurium* DT170 associated with kebab meat and yoghurt relish. *Epidemiology and Infection*, 122(3), 377-383. doi:10.1017/S0950268899002253
- Feng, Y., Liu, J., Li, Y. G., Cao, F. L., Johnston, R. N., Zhou, J., ... & Liu, S. L. (2012). Inheritance of the *Salmonella* virulence plasmids: mostly vertical and rarely horizontal. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(5), 1058-1063.
- Fortini, M. E., Skupski, M. P., Boguski, M. S., & Hariharan, I. K. (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *The Journal of cell biology*, 150(2), F23–F30.

<https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.f23>

- 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>
- Frias Salcedo Jose Antonio. (29 de marzo de 2009). Bacteriemia por salmonela no tifoídica en pacientes inmunocomprometidos. *ENF INF MICROBIOL*, *3*, 145-149. 2020, abril 20, Recuperado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2009/ei094f.pdf>.
- Gebreyes, W. A., Thakur, S., Dorr, P., Tadesse, D. A., Post, K., & Wolf, L. (2009). Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. *Journal of clinical microbiology*, *47*(3), 777–780. <https://doi.org/10.1128/JCM.01660-08>
- Gilchrist, J. J., & MacLennan, C. A. (2019). Invasive Nontyphoidal *Salmonella* Disease in Africa. *EcoSal Plus*, *8*(2), 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2018>
- Greenwood, M. H., & Hooper, W. L. (1983). Chocolate bars contaminated with *Salmonella* napoli: an infectivity study. *British medical journal (Clinical research ed.)*, *286*(6375), 1394. <https://doi.org/10.1136/bmj.286.6375.1394>
- Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, *9*, 1-166.
- Guiney, D. G., & Fierer, J. (2011). The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Frontiers in microbiology*, *2*, 129. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00129>
- Haley, C. A., Dargatz, D. A., Bush, E. J., Erdman, M. M., & Fedorka-Cray,

- P. J. (2012). *Salmonella* prevalence and antimicrobial susceptibility from the National Animal Health Monitoring System Swine 2000 and 2006 studies. *Journal of food protection*, 75(3), 428-436.
- 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(3), 1675–1685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1675>
 - Hennessey, T. W., Hedberg, C. W., Slutsker, L., White, K. E., Besser-Wiek, J. M., Moen, M. E., Feldman, J., Coleman, W. W., Edmonson, L. M., MacDonald, K. L., & Osterholm, M. T. (1996). A national outbreak of *Salmonella enteritidis* infections from ice cream. The Investigation Team. *The New England journal of medicine*, 334(20), 1281–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJM199605163342001>
 - Hernández, Nora Bazán. (2018). Compendio Estadístico 2018. 2020, mayo 30, de Consejo de la carne Recuperado de <https://comecarne.org/estadisticas/>
 - 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>
 - Jiang, L., Feng, L., Yang, B., Zhang, W., Wang, P., Jiang, X., & Wang, L. (2017). Signal transduction pathway mediated by the novel regulator LoiA for low oxygen tension induced *Salmonella* Typhimurium invasion. *PLoS pathogens*, 13(6), e1006429. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006429>
 - Kapperud, G., Gustavsen, S., Hellesnes, I., Hansen, A. H., Lassen, J., Hirn, J., & Helmuth, R. (1990). Outbreak of *Salmonella Typhimurium*

infection traced to contaminated chocolate and caused by a strain lacking the 60-megadalton virulence plasmid. *Journal of clinical microbiology*, 28(12), 2597-2601.

- Kasuga, F., Hirota, M., Wada, M., Yunokawa, T., Toyofuku, H., Shibatsuji, M., & Kumagai, S. (2004). Archiving of food samples from restaurants and caterers—quantitative profiling of outbreaks of foodborne salmonellosis in Japan. *Journal of food protection*, 67(9), 2024-2032.
- Keestra-Gounder, A. M., Tsolis, R. M., & Bäumler, A. J. (2015). Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nature reviews. Microbiology*, 13(4), 206–216. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3428>
- Kennedy, B., Shobo, C. O., Zishiri, O. T., & Bester, L. A. (2020). Surveillance of *Salmonella* spp. in the environment of public hospitals in KwaZulu-Natal, South Africa. *The Journal of hospital infection*, 105(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.02.019>
- Kim-Jo, C., Gatti, J. L., & Poirié, M. (2019). *Drosophila* Cellular Immunity Against Parasitoid Wasps: A Complex and Time-Dependent Process. *Frontiers in physiology*, 10, 603. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00603>
- Krawiec, M., Kuczkowski, M., Kruszewicz, A. G., & Wieliczko, A. (2015). Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. *BMC veterinary research*, 11, 15. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0332-x>
- Khush, R. S., & Lemaitre, B. (2000). Genes that fight infection: what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends in Genetics*, 16(10), 442-449.
- Kurtz, J. R., Goggins, J. A., & McLachlan, J. B. (2017). *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology letters*, 190, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>
- Kutzer, M., Kurtz, J., & Armitage, S. (2019). A multi-faceted approach

testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. *The Journal of animal ecology*, 88(4), 566–578. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953>

- Pasmans, F., Van Immerseel, F., Heyndrickx, M., Martel, A., Godard, C., Wildemauwe, C., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2003). Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium variant Copenhagen phage type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. *Infection and immunity*, 71(10), 6068–6074. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6068-6074.2003>
- Lamas, A., Fernandez-No, I. C., Miranda, J. M., Vázquez, B., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2016). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011-2015). *Poultry science*, 95(9), 2097–2105. <https://doi.org/10.3382/ps/pew150>
- Leclerc, V., & Reichhart, J. M. (2004). The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological reviews*, 198, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x>
- Lee, J., Geddes, K., Streutker, C., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2012). Role of mouse peptidoglycan recognition protein PGLYRP2 in the innate immune response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in vivo. *Infection and immunity*, 80(8), 2645–2654. <https://doi.org/10.1128/IAI.00168-12>
- Madajczak, G., & Binek, M. (2005). Znaczenie plazmidowego zgrupowania genów spv w chorobotwórczości pałeczek *Salmonella Enteritidis* dla kur. I. Występowanie zgrupowania genów spv w dużych plazmidach zjadliwości pałeczek *Salmonella Enteritidis* [Influence of spv plasmid genes group in *Salmonella Enteritidis* virulence for chickens. I. Occurrence of spv plasmid genes group in *Salmonella Enteritidis* large virulence plasmid]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 57(2), 163–

174.

- Madden T. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2002 Oct 9 [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. The NCBI Handbook [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002-. Chapter 16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Marder Mph, E. P., Griffin, P. M., Cieslak, P. R., Dunn, J., Hurd, S., Jervis, R., Lathrop, S., Muse, A., Ryan, P., Smith, K., Tobin-D'Angelo, M., Vugia, D. J., Holt, K. G., Wolpert, B. J., Tauxe, R., & Geissler, A. L. (2018). Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2017. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 67(11), 324–328. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6711a3>
- MATSUI, T., SUZUKI, S., TAKAHASHI, H., OHYAMA, T., KOBAYASHI, J., IZUMIYA, H., OKABE, N. (2004). Salmonella Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: Cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001. *Epidemiology and Infection*, 132(5), 873-879. doi:10.1017/S0950268804002778
- Miller, T., Prager, R., Rabsch, W., Fehlhaber, K., & Voss, M. (2010). Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Inf*, 45(2), 27.
- Miroid, S., Rabsch, W., Rohde, M., Stender, S., Tschäpe, H., Rüssmann, H., Igwe, E., & Hardt, W. D. (1999). Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* typhimurium strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), 9845–9850. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9845>

- Mohamed, T., Zhao, S., White, D. G., & Parveen, S. (2014). Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky isolated from pre- and post-chill whole broilers carcasses. *Food Microbiology*, 38, 6–15. doi:10.1016/j.fm.2013.08.002
- Nataro, J. P. (2004). Vaccines against diarrheal diseases. In *Seminars in pediatric infectious diseases* (Vol. 15, No. 4, pp. 272-279). WB Saunders.
- Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E., & Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14057-14059.
- Norma oficial mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- Organización Mundial de la Salud. (2022). *Salmonella* (no tifoidea). 2022, mayo 23, de Organización Mundial de la Salud Recuperado de [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
- Organización Mundial de la Salud. (2022). Inocuidad de los alimentos. 2022, mayo 23, de Organización Mundial de la Salud Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- PAC, 1995, 67, 1699. (*Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)*) on page 1702
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., & Barrell, B. G. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, 413(6858), 848-852.
- Regalado-Pineda, I. D., Rodarte-Medina, R., Reséndiz-Nava, C. N., Saenz-Garcia 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 (Basel, Switzerland)*, 9(3), 264. <https://doi.org/10.3390/foods9030264>

- Reitler, R., Yarom, D., & Seligmann, R. (1960). The Enhancing Effect of Staphylococcal Enterotoxin on Salmonella Infection. *Medical Officer*, 104(12).
- RIZWANA TASMIN, PAUL A. GULIG, SALINA PARVEEN; Detection of Virulence Plasmid-Encoded Genes in *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky Isolates Recovered from Commercially Processed Chicken Carcasses. *J Food Prot* 1 August 2019; 82 (8): 1364–1368. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-552>
- Rodriguez A., Pangloli P., Richards H. A., Mount J. R., Draughon F. A. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. *Journal of Food Protection*. 2006;69(11):2576–2580.
- Rolhion, N., Furniss, R. C. D., Grabe, G., Ryan, A., Liu, M., Matthews, S. A., & Holden, W. (2016). Inhibition of nuclear transport of NF-κB p65 by the *Salmonella* type III secretion system effector SpvD. *PLoS pathogens*, 12(5).
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States- - major pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):7-15.
- Secretaria de Salud. (2022). Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. 08 de Junio de 2022, de Gobierno de México. Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-261547>
- Seribelli AA, Cruz MF, Vilela FP, Frazão MR, Paziani MH, et al. (2020) Correction: Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil.

e0240055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240055>

- Shannon E. Majowicz, Jennie Musto, Elaine Scallan, Frederick J. Angulo, Martyn Kirk, Sarah J. O'Brien, Timothy F. Jones, Aamir Fazil, Robert M. Hoekstra, for the International Collaboration on Enteric Disease “Burden of Illness” Studies, The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 50, Issue 6, 15 March 2010, Pages 882–889,
- Shivaning Karabasanavar, N., Benakabhat Madhavaprasad, C., Agalagandi Gopalakrishna, S., Hiremath, J., Shivanagowda Patil, G., & Barbuddhe, S. (2020). Prevalence of *Salmonella* serotypes S. Enteritidis and S. Typhimurium in poultry and poultry products. *Journal of Food Safety*, 40(6), e12852.
- Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M., & Kanuka, H. (2009). p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. *Cell host & microbe*, 6(3), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.010>
- Silva, C., Puente, J. L., & Calva, E. (2017). *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathogens and disease*, 10.1093/femspd/ftx070. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx070>
- Silva, Gabriela; López, Héctor (2012) Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de *Salmonella* en modelos animales Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol. 25, núm. 1, enero-marzo, 2012, pp. 107-122 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia)
- 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: JoVE*, (135), 57676. <https://doi.org/10.3791/57676>
- 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>

- Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
- Teunis, P. F., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I. D., Rotariu, O., & Strachan, N. J. (2010). Dose-response modeling of *Salmonella* using outbreak data. *International journal of food microbiology*, 144(2), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.026>
- Suez, J., Porwollik, S., Dagan, A., Marzel, A., Schorr, Y. I., Desai, P. T., Agmon, V., McClelland, M., Rahav, G., & Gal-Mor, O. (2013). Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PloS one*, 8(3), e58449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058449>
- Tran, Q. T., Gomez, G., Khare, S., Lawhon, S. D., Raffatellu, M., Bäumlér, A. J., Ajithdoss, D., Dhavala, S., & Adams, L. G. (2010). The *Salmonella enterica* serotype Typhi Vi capsular antigen is expressed after the bacterium enters the ileal mucosa. *Infection and immunity*, 78(1), 527–535. <https://doi.org/10.1128/IAI.00972-09>
- Tyson, G. H., Li, C., Harrison, L. B., Martin, G., Hsu, C. H., Tate, H., Tran, T. T., Strain, E., & Zhao, S. (2021). A Multidrug-Resistant *Salmonella* Infantis Clone is Spreading and Recombining in the United States. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 27(6), 792–799. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0389>
- 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 of the United States of America*, 99(4),

2152–2157. <https://doi.org/10.1073/pnas.042411999>

- Vought, K. J., & Tatini, S. R. (1998). Salmonella enteritidis contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak. *Journal of food protection*, 61(1), 5–10. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-61.1.5>
- Wong, K. K., McClelland, M., Stillwell, L. C., Sisk, E. C., Thurston, S. J., & Saffer, J. D. (1998). Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a Salmonella pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Infection and immunity*, 66(7), 3365-3371.
- Yang, F., Jiang, Y., Yang, L., Qin, J., Guo, M., Lu, Y., Chen, H., Zhuang, Y., Zhang, J., Zhang, H., Dai, Z., Li, M., Yang, C., Chen, M., Zhang, Y., & Zhao, H. (2018). Molecular and Conventional Analysis of Acute Diarrheal Isolates Identifies Epidemiological Trends, Antibiotic Resistance and Virulence Profiles of Common Enteropathogens in Shanghai. *Frontiers in microbiology*, 9, 164. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00164>
- Zeng, H., De Reu, K., Gabriël, S., Mattheus, W., De Zutter, L., & Rasschaert, G. (2021). *Salmonella* prevalence and persistence in industrialized poultry slaughterhouses. *Poultry science*, 100(4), 100991. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.01.014>