



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
Y  
BIOLÓGICAS  
“Dr. IGNACIO CHÁVEZ”**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO**

**TESIS**

**RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA A ESTRÉS  
DENTRO DEL HOSPEDERO Y VIRULENCIA ENTRE  
GENOTIPOS DE *Salmonella enterica***

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

QFB. Cristina Linares Salgado

**DIRECTOR DE TESIS:**

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

Morelia, Mich., Agosto 2020

Comité tutorial designado para el seguimiento y revisión de la tesis presentada por:

Química Farmacobióloga  
CRISTINA LINARES SALGADO

Doctora en Ciencias  
Virginia Angélica Robinson Fuentes

---

Doctor en Ciencias  
Gerardo Vázquez Marrufo

---

Doctora en Ciencias  
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

---

Doctora en Ciencias Biológicas  
Ana Edith Higareda Mendoza

---

Doctor en Ciencias  
Joel Edmundo López Meza

---

La estudiante  
agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada  
durante la realización de su tesis.

Núm. de becario CONACYT: 702758

Se agradece también el apoyo brindado por CONACYT  
para la realización de una estancia de investigación en la Facultad de Biología de  
la Universidad de Sevilla, España.

El presente trabajo de Tesis se realizó bajo la Dirección del Dr. Gerardo Vázquez Marrufo, en el Laboratorio de Genética Molecular Microbiana, de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez,” y en el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Se agradece al Programa de Investigación 2019-2020 de la Coordinación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo recibido.

El trabajo se llevó a cabo con la colaboración del Ph. D. Joseph Casadesús, Catedrático de Genética en la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, España.

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo y a la Dra. Soledad Vázquez Garcidueñas por su tiempo, paciencia, confianza y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, fue un honor trabajar en su laboratorio, gracias por inspirarme profesionalmente, con la pasión con la que hacen su trabajo.

A mi comité tutorial: la Dra. Virginia Robinson Fuentes, la Dra. Ana Edith Higareda Mendoza y al Dr. Joel Edmundo López Meza, por el tiempo dedicado y por todas las observaciones que hicieron para la mejora de este proyecto.

Gracias al Dr. Joseph Casadesús por recibirme en su laboratorio, por colaborar en este trabajo y por la hospitalidad con la que me recibió; a mis compañeros de laboratorio, Ángela, Maritoñi, Rocío y David que también contribuyeron en la realización de este trabajo y que, sin duda hicieron que mi estancia en su laboratorio fuese muy grata.

Gracias a todos mis amigos, compañeros de laboratorio y de generación por hacer que el día a día en el Posgrado fuese más ameno. Gracias por ser parte de esta experiencia, por las risas y estrés que juntos pasamos.

Sin duda, gracias a mis padres, a mi familia y a mi novio, a todos ellos gracias por su apoyo incondicional, por siempre motivarme a seguir adelante y ser inspiración de superación en mi vida; toda mi dedicación y esfuerzo se las dedico a ellos.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Generalidades del género <i>Salmonella</i></b>	<b>4</b>
<b>2.2 Clasificación</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Epidemiología de <i>Salmonella enterica</i> en México</b>	<b>6</b>
<b>2.3.1 Epidemiología de ST determinada por MLST</b>	<b>7</b>
<b>2.4 Patogenicidad</b>	<b>8</b>
<b>2.5 Factores de virulencia</b>	<b>10</b>
2.5.1 Plásmido de virulencia	11
<b>2.6 Resistencia a estrés</b>	<b>12</b>
2.6.1 Resistencia a estrés ambiental	12
2.6.2. Resistencia a estrés y daño celular dentro del hospedero	14
2.6.3 Respuesta al estrés ácido	15
2.6.4 Respuesta al estrés oxidante	16
2.6.5 Respuesta al estrés biliar	17
<b>2.7 Internalización <i>in vitro</i> de <i>S. enterica</i> en distintas líneas celulares</b>	<b>18</b>
<b>2.8 Formación de células filamentosas</b>	<b>19</b>
<b>2.9 Formación de biofilm</b>	<b>20</b>
<b>2.10 Genómica poblacional de <i>Salmonella</i> Typhimurium</b>	<b>21</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL	23
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>24</b>
<b>7.0 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
7.1 Material biológico	25
7.2 Medios de cultivo	25

<b>7.3 Ensayos de estrés ácido</b>	<b>25</b>
7.3.1 Respuesta al estrés ácido en una escala de pH de 1 a 3	25
7.3.2 Respuesta al estrés ácido a un pH de 1.5	26
7.3.3 Respuesta de tolerancia al ácido	26
7.3.4 Formación de células filamentosas	26
7.3.5 Ensayo de recuperación post-estrés ácido	27
<b>7.4 Ensayos de estrés oxidante</b>	<b>27</b>
7.4.1 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a una concentración de 1mM	27
7.4.2 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a una concentración de 3 a 30mM	27
<b>7.5 Ensayos de estrés biliar</b>	<b>28</b>
7.5.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio (DOC)	28
7.5.2 Muerte celular ocasionada por desoxicolato de sodio (DOC)	28
7.5.3 Formación de biofilm	28
<b>7.6 Ensayos de invasión <i>in vitro</i></b>	<b>29</b>
7.6.1 Ensayos de invasión sin estrés	29
7.6.2 Ensayos de invasión postestrés	29
<b>7.8 Amplificación por PCR de los genes de virulencia y resistencia a estrés</b>	<b>30</b>
7.8.1 Extracción de ADN de los aislados bacterianos	30
7.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes de interés	31
7.8.3 Purificación y secuenciación del gen <i>rpos</i>	32
<b>7.9 Análisis estadístico</b>	<b>32</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>8.1 Resistencia a estrés ácido</b>	<b>34</b>
8.1.1 Formación de células filamentosas	35
8.1.2 Recuperación post-estrés ácido.	36
<b>8.2 Resistencia a estrés oxidativo</b>	<b>37</b>

8.2.1 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) a una concentración de 1mM	<b>38</b>
<b>8.3 Resistencia a estrés con desoxicolato de sodio (DOC)</b>	<b>40</b>
8.3.1 Concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio (DOC)	<b>40</b>
8.3.2 Formación de biofilm a distintas concentraciones de DOC	<b>41</b>
8.3.3 Muerte celular ocasionado por DOC	<b>44</b>
<b>8.4 Análisis del gen <i>rpoS</i></b>	<b>46</b>
<b>8.5 Amplificación de los genes <i>spvA</i>, <i>rcK</i> y <i>pefC</i></b>	<b>46</b>
<b>8.6 Ensayos de invasión</b>	<b>47</b>
8.6.1 Invasión en células HeLa en condiciones sin estrés	<b>47</b>
8.6.2 Invasión de células HeLa en condiciones post-estrés a DOC	<b>49</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
9.1 Estrés ácido	<b>50</b>
9.2 Estrés oxidante	<b>51</b>
9.3 Estrés biliar	<b>54</b>
9.4 Ensayos de invasión y genes de virulencia	<b>56</b>
9.5 Formación de biofilm	<b>58</b>
<b>10. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b>	<b>61</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>62</b>
<b>12. ANEXO</b>	<b>73</b>
12.1 Secuencia ATCC 14028 (ST19)	<b>73</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	Descripción de las cepas de estudio	<b>25</b>
<b>2</b>	Pruebas estadísticas aplicadas en los distintos ensayos realizados	<b>33</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Clasificación actualizada del género <i>Salmonella</i>	4
2	Estructura de la pared celular de las enterobacterias	5
3	Estrategias de invasión de <i>Salmonella enterica</i>	9
4	Mapa físico del plásmido de virulencia pSLT	12
5	Estrategias para resistir el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de <i>Salmonella enterica</i>	17
6	Respuesta al estrés ácido de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> de estudio	35
7	Morfología y porcentajes de filamentación que presentaron las cepas de estudio	36
8	Recuperación post-estrés ácido de las cepas de estudio	37
9	Sensibilidad de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> de estudio a distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38
10	Sensibilidad de las cepas de estudio a peróxido de hidrógeno a una concentración de 1 mM comparadas a distintos tiempos durante 6 h	39
11	Sensibilidad de cada cepa de estudio a peróxido de hidrógeno una concentración de 1 mM	40
12	Concentración mínima inhibitoria de DOC de las cepas de estudio de <i>Salmonella enterica</i>	41
13	Formación de biofilm en distintas concentraciones de DOC de la cepa ATCC14028 (ST19)	42

<b>14</b>	Formación de biofilm en distintas concentraciones de DOC de la cepa ST19 (SAL004)	<b>42</b>
<b>15</b>	Formación de biofilm en distintas concentraciones de DOC de la cepa ST213 (SAL115)	<b>43</b>
<b>16</b>	Formación de biofilm a una concentración de 1% de DOC de las cepas de estudio	<b>43</b>
<b>17</b>	Muerte celular ocasionada por desoxicolato de sodio a las cepas de <i>Salmonella enterica</i>	<b>44</b>
<b>18</b>	Imágenes representativas por cepa donde se muestra el porcentaje de células viables y células muertas a una concentración de 0% y 6% de DOC	<b>45</b>
<b>19</b>	Amplificación del gen <i>rpos</i> de las cepas de estudio	<b>46</b>
<b>20</b>	Amplificación de tres genes de virulencia del plásmido pSLT en las cepas de estudio	<b>47</b>
<b>21</b>	Invasión de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en células HeLa comparadas respecto a la cepa control negativo (ATCC14028 $\Delta$ SPI-1)	<b>48</b>
<b>22</b>	Invasión de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en células HeLa	<b>48</b>
<b>23</b>	Invasión de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> en células HeLa en condiciones post-estrés	<b>49</b>

## ABREVIATURAS

D.E.	Desviación estándar
DOC	Desoxicolato de sodio
E.E.	Error Estándar
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
LB	Luria Bertani
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MDI	Multiplicidad de Infección
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (oxidado)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (reducido)
ns	estadísticamente no significativo
PBS	Buffer salino de fosfatos
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
Rpm	Revoluciones por minuto
ST	Secuencia Tipo
TA	Temperatura Ambiente
TGC	Tracto gastrointestinal del hospedero

UFC	Unidad formadora de colonias
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la salud)

## RESUMEN

*Salmonella enterica* es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos, siendo el serotipo Typhimurium el de mayor incidencia global. En el tracto gastrointestinal del hospedero (TGH), *S. Typhimurium* enfrenta factores de estrés como la acidez estomacal y la exposición a sales biliares y especies reactivas de oxígeno, a lo que responde induciendo la expresión de genes de resistencia a estrés, y formando células filamentosas y biofilm. Por co-regulación transcripcional con los genes de resistencia a estrés, también se inducen genes de virulencia. La secuencia tipo ST19 es el genotipo fundador y más abundante del serotipo Typhimurium. En México, el genotipo ST213 ha reemplazado al ST19, posiblemente por una mayor resistencia al estrés dentro del hospedero, por lo que quizá también es más virulento. Se evaluó aquí la relación entre la resistencia al estrés del TGH y la virulencia de cepas ambientales de los genotipos ST213 y ST19, y de la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) de *S. Typhimurium*. Aunque las tres cepas formaron filamentos a pH estomacal simulado de 1.5, la ATCC fue sensible después de 20 min, pero las cepas ST19 y ST213 sobrevivieron después de 60 min. La cepa ST19 fue más resistente que la ST213 al ambiente oxidante ( $H_2O_2$ ) y al desoxicolato de sodio (DOC), que simula las sales biliares. Pero la cepa ST213 presentó mejor recuperación a las condiciones de estrés ácido y oxidativo después de 6 h, que ambas ST19. Las tres cepas formaron biofilm en DOC al 1%, pero las de genotipo ST19 tuvieron mayor porcentaje de muerte celular que la ST213 al 6% de DOC; además, la cepa ST213 conservó la capacidad de invadir células HeLa post-estrés DOC (6%), pero ST19 no. Las cepas ST19 portan los genes de virulencia *spvA*, *rcK* y *pefC*, y la cepa ST213 no. La secuencia del gen de respuesta a estrés *rpoS* reveló una mutación no sinónima en ST213. Así, solo ciertas condiciones de estrés del TGH inducen una respuesta diferencial entre los genotipos analizados, sin observarse una relación estrés-virulencia definida. Son necesarios más estudios para conocer las estrategias del genotipo ST213 para reemplazar al genotipo ST19, y su impacto en salud pública.

**Palabras clave:** *Salmonella enterica*, ST213, ST19, hospedero, estrés, virulencia.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* is one of the main etiological agents of gastrointestinal diseases transmitted by food, being the Typhimurium serotype the one with the highest global incidence. In its passage through the gastrointestinal tract, *S. Typhimurium* faces stress conditions such as low stomach pH, the exposure to bile salts and reactive oxygen species, to which it responds by inducing the expression of stress resistance genes and forming filamentous cells and biofilm. By transcriptional co-regulation with stress resistance genes, virulence genes are also induced. The ST19 sequence type is the founding genotype of the Typhimurium serotype, being the most abundant worldwide. In Mexico, this genotype has been replaced by ST213, which can be attributed to a greater resistance to stress within the host than the ST19 genotype, and is also possibly more virulent. In this work, the relationship between resistance to stress within the host and virulence of strains of ST213 and ST19 genotypes, and of the reference strain ATCC 14028 (ST19) of *S. Typhimurium*, was evaluated. Despite that the three strains formed filaments before and after acid stress at pH 1.5, simulating stomach pH, such condition was lethal for the ATCC strain after 20 min, but not for the ST19 and ST213 strains after 60 min. The ST19 strain was more resistant than ST213 to the oxidizing environment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and to bile salts simulated with sodium deoxycholate (DOC). However, the ST213 strain had better recovery to acid and oxidative stress conditions after 6 h, than both ST19 strains. All strains formed biofilm in the presence of DOC at 1%, but ATCC and the environmental ST19 strain had a higher percentage of cell death than ST213 of DOC at 6%; whereas the ST213 strain remains invasive towards HeLa cells, ST19 lost this ability after such stress. Both ST19 strains carriage the *spvA*, *rcK* and *pefC* virulence genes, but the ST213 strain does not. The sequence of the *rpoS* stress response gene revealed non-synonymous mutation in the ST213 strain. Obtained results show that only certain stress conditions of the digestive tract elicit a differential response between the analyzed genotypes, without observing a defined stress-virulence relationship. More studies are needed to understand the strategies of the ST213 genotype to replace the ST19 genotype, and the possible public health consequences of such turnover.

**Key words:** *Salmonella enterica*, ST213, ST19, virulence, stress, resistance.

## 1. INTRODUCCIÓN

La especie de enterobacteria *Salmonella enterica* es uno de los principales agentes etiológicos de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos. Cada año se enferman 550 millones de personas por la ingestión de alimentos contaminados, de las cuales 220 millones son niños menores de 5 años. Este patógeno es uno de los cuatro agentes causales principales de enfermedades a nivel mundial. Los dos serotipos más importantes de dicho patógeno, transmitidos de animales a seres humanos en la mayor parte del mundo, son el serotipo Enteritidis y el serotipo Typhimurium (WHO, 2018).

En México, los estudios epidemiológicos sobre *S. enterica* de relevancia en la Salud Pública se han enfocado principalmente a registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. Hacia el final del siglo pasado, se documentó que el serotipo más común encontrado en los pacientes ingresados a los servicios de salud pública era el serotipo Typhimurium, y el menos frecuente, Ohio (Gutiérrez-Cogco *et al.*, 2000). Más recientemente, de acuerdo con datos del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (InDRE), del año 2011 a 2015 los serotipos más frecuentes fueron Enteritidis y Typhimurium. En Michoacán, la prevalencia registrada de contaminación por *S. enterica* en carne de bovino es del 16%, de un 5.8% del patógeno en casos de niños con episodios de diarrea, y de aproximadamente 2% en muestras de niños asintomáticos. En particular, los serotipos más frecuentemente aislados de carne de res en el estado de Michoacán son Typhimurium (34.1%) y Derby (24.4%), seguidos del Anatum (9.8%), más otros 11 serotipos en menor proporción. En total, se han detectado 24 serotipos distintos contaminando carne de cerdo, res y pollo en el estado de Michoacán (Regalado-Pineda *et al.*, 2011; Kuk-Soberanis *et al.*, 2016).

Comúnmente, las infecciones por *S. enterica* que involucran serotipos invasivos son potencialmente mortales en los grupos más susceptibles como bebés, niños pequeños, adultos inmunocomprometidos, personas infectadas por VIH, malaria y personas con una alimentación deficiente (Balasubramanian *et al.*, 2018). Los cambios asociados a las poblaciones microbianas son otro factor que favorece



la dispersión y virulencia de este patógeno, como la resistencia a antibióticos; dicho problema genera un impacto en el área de la salud pública y económica, al incrementar los costos asociados con vigilancia, prevención y tratamiento de enfermedades. Los estudios epidemiológicos indican que los serotipos de *S. enterica* multidrogosresistentes (MDR) son más virulentos que las cepas susceptibles, esto se ve reflejado en el aumento de la gravedad de los pacientes infectados (Ao *et al.*, 2015; Eng *et al.*, 2015). Además, se ha documentado que la respuesta de *S. enterica* a diferentes condiciones de estrés ambiental que enfrenta afuera del hospedero, no solo impactan a la sobrevivencia y crecimiento del patógeno, sino que también pueden influir en la virulencia y la multi-resistencia a antibióticos (Kenyon y Spector, 2012). También, se sabe que el estrés favorece la formación de células filamentosas provocando un aumento en la biomasa total, fenómeno que al presentarse en un alimento contaminado incrementa la probabilidad de causar infecciones (Finn *et al.*, 2013).

Estudios genómico epidemiológicos han documentado cambios recientes en la prevalencia de genotipos determinados a nivel de tipificación mediante secuencias de múltiples locus (MLST, *Multi Locus Sequence Typing*), dentro del serotipo Typhimurium. Tal es el caso del genotipo ST313 en el Africa Sub-Sahariana (Panzenhagen *et al.*, 2018) y de la ST34 en China (Li *et al.*, 2017), ambos desplazando a la ST19, considerado el genotipo fundador (Atchman *et al.*, 2012). A nivel epidemiológico y de salud pública, el descubrimiento de recambio de prevalencia entre genotipos de un mismo serotipo es relevante y que permite evaluar el potencial de dispersión y virulencia a un nivel de discriminación más fino, no evidente en estudios epidemiológicos basados en serotipos. Así, el genotipo ST313 muestra capacidad para causar enfermedad sistémica (Parsons *et al.*, 2013), mientras que el genotipo ST213 presenta multi-drogo resistencia (Wiesner *et al.*, 2011).

El recambio de genotipos de *S. Typhimurium* también está documentado en México, en donde el genotipo ST213 ha desplazado en incidencia en alimentos y muestras clínicas al ST19 (Zaidi *et al.*, 2008). Estudios posteriores han encontrado que cepas del genotipo ST213 aisladas de alimentos del estado de Michoacán, logran sobrevivir a condiciones fisicoquímicas asociadas a la preservación de

alimentos y muestran estrategias de virulencia como la formación de biofilm y la filamentación. Así mismo, cepas de dicho genotipo presentan mayor capacidad de internalizar células, lo cual se ha demostrado en estudios *in vitro* con células Caco-2 (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019). No obstante, a la fecha no se ha determinado cómo responde el genotipo ST213 a los factores de estrés asociados al hospedero, y si dicha respuesta es diferente a la del genotipo ST19. En el presente trabajo se pretende evaluar estos aspectos.

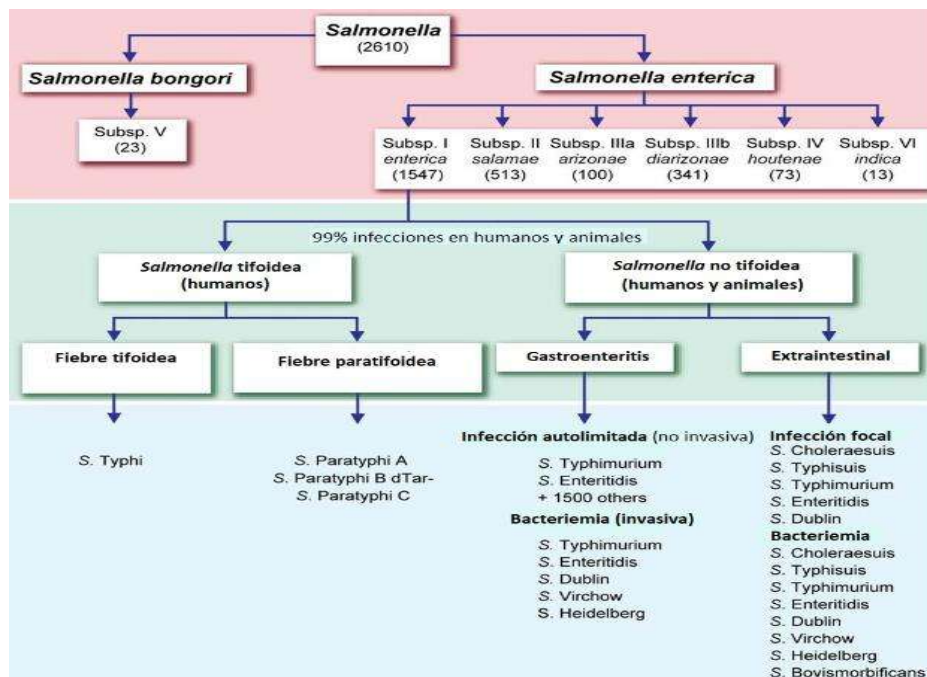
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del género *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyas especies presentan las características citológicas de ser bacilos Gram Negativos de 2 a 5 µm de largo por 0.5 a 1.5 µm de ancho, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, generalmente móviles, provistos de flagelos peritricos a excepción de *S. Gallinarum*. No producen indol, no degradan la urea, y son capaces de descarboxilar lisina y ornitina (Andino *et al.*, 2015).

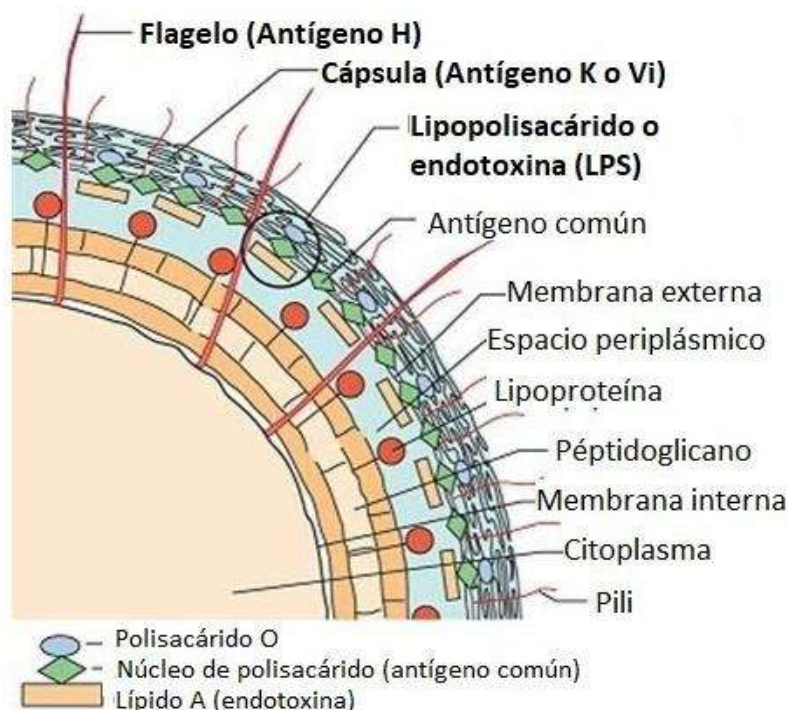
### 2.2 Clasificación

Este género está constituido únicamente de dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Seis subespecies pertenecen a la especie *enterica*, siendo *Salmonella enterica* subespecie *enterica* la que incluye a más de la mitad de los serotipos que conforman este género (Brenner *et al.*, 2000; Achtman *et al.*, 2014), como se puede observar en la figura 1.



**Figura 1.** Clasificación actualizada del género *Salmonella* (imagen modificada de Achtman *et al.*, 2014).

De acuerdo con la presencia de los antígenos O de lipopolisacárido, Vi de polisacárido capsular y H flagelar (Fig. 2), las cepas de *Salmonella enterica* pueden serotipificarse (Jurado-Jiménez *et al.*, 2010) y ser clasificadas bajo el esquema Kauffmann-White (Figura 1). Este esquema consiste en la asignación de serotipo a cepas del género *Salmonella*, con base en reacciones de aglutinación con antisueros que son específicos para los epítopes del antígeno O, H o Vi; lo cual ha permitido identificar a más de 2,600 serotipos (Atchman *et al.*, 2012), a los que también se les designa como serovariedades.



**Figura 2.** Estructura de la pared celular de las enterobacterias. Las estructuras que constituyen los epítopes de superficie para la serotipificación de *Salmonella enterica* se encuentran en negrita (imagen modificada de Caffer, 2001).

Los serotipos que pertenecen a la subespecie *enterica* están estrechamente relacionados con las infecciones de los vertebrados de sangre caliente (Uzzau *et al.*, 2000; Gal-Mor, 2019). Sin embargo, entre los serotipos se presentan diferencias importantes tales como el tipo de hospederos a los cuales infectan y los síntomas clínicos de la enfermedad que producen. Así, los serotipos Enteritidis y Typhimurium poseen un amplio rango de hospederos y frecuentemente generan

una enfermedad gastrointestinal en el ser humano, infección sistémica en el ratón y un cuadro crónico asintomático en aves (Bäumler et al., 2013; Gal-Mor, 2019). Otros serotipos, en cambio, tienen una alta especificidad de hospedero y generalmente causan la enfermedad en una única especie animal, como es el caso del serotipo Typhi (*S. Typhi*), que afecta sólo al ser humano generando una enfermedad sistémica denominada fiebre tifoidea (Parkhill et al., 2001; Gal-Mor, 2019).

### **2.3 Epidemiología de *Salmonella enterica* en México**

*Salmonella enterica* es uno de los agentes patógenos más comúnmente asociados con alimentos contaminados (WHO, 2008). Se han descrito más de 2,600 serotipos de *Salmonella* spp. y aproximadamente el 60% de éstos dentro de la especie *S. enterica*, la cual contiene la mayoría de serotipos que son patógenos de humano (Popoff et al., 2001; Atchman et al., 2012).

En México, los estudios sobre *S. enterica* y su importancia en la salud pública se han enfocado principalmente en registrar la incidencia de ésta en casos de diarrea, así como a distinguir los serotipos más frecuentes. En un estudio realizado en cuatro estados con distintas características socioeconómicas (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán), se aisló *S. enterica* del 12.3% (2,893 muestras) de niños menores de 6 años con cuadro de diarrea y del 5.3% (6,685 muestras) de niños asintomáticos (Zaidi et al., 2008). Los serotipos más comúnmente aislados de niños con padecimiento gastrointestinales fueron Typhimurium (22.2%) y Enteritidis (14.5%), encontrándose en menor proporción también los serotipos Agona, Muenchen, Oranienburg, Anatum, Newport y Meleagridis. En este mismo estudio, se encontró una alta incidencia de contaminación de carne de res por *S. enterica* (21.3%-36.4) al analizar 1,733 muestras de carne en expendios de venta al menudeo.

Aunque la carne de aves de corral, cerdo y res ha sido considerada históricamente como fuente potencial de salmonelosis, algunos reportes indican que el queso crudo también puede ser una fuente importante de infecciones por *S. enterica* en México. Por ejemplo, Miranda et al. (2009) analizaron un total de 441 muestras de alimentos crudos provenientes del centro de México (Hidalgo), encontrando que el 21.1% estaba contaminado con *S. enterica*, y el 30.3% de las

muestras contaminadas provenían de queso crudo. De la misma manera, González y Franco (2015) encontraron *S. enterica* en una muestra representativa de quesos de una comunidad de Oaxaca. Mientras que Sánchez-Valdés *et al.* (2016) encontraron la presencia del patógeno en queso fresco de cinco queserías de Zacazonapan, Estado de México. En particular, nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP-Michoacán) ha encontrado que los serotipos aislados más frecuentemente de derivados lácteos, carne de cerdo, res y pollo en el estado de Michoacán, son Typhimurium (13%), Anatum (12%), serogrupo B (11%) y Agona (9%), encontrándose en menor proporción otros 30 serotipos (Regalado-Pineda *et al.*, 2011). La presencia de serotipos poco comunes en alimentos, pero asociados a brotes de diarrea, se ha documentado para Michoacán tal como se reportó en un brote en la prisión estatal ocasionado por cepas del serotipo Oranienburg, las cuales presentaron resistencia múltiple a antibióticos (Vázquez-Garcidueñas *et al.*, 2014).

### **2.3.1 Epidemiología de ST determinada por MLST**

En una gran mayoría de sistemas de salud de diversos países, la vigilancia epidemiológica de *S. enterica* consiste en reportar los serotipos obtenidos de brotes o de alimentos en esquemas de muestreo determinados (Antunes *et al.*, 2016). Tal es el caso de México, en el que los reportes de serotipos encontrados se basan en la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios: Métodos para la Determinación de Salmonella en Alimentos. No obstante, desde la última década del siglo pasado fueron emergiendo esquemas de tipificación basados en marcadores genético- moleculares, para diferenciar entre cepas dentro de un brote de las que no lo son, y así establecer cadenas de dispersión (Atchman *et al.*, 2012). Aunque en la actualidad los esquemas de tipificación avanzados se basan ya en la comparación de genomas completos (Land *et al.*, 2015), el esquema de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), basado en los polimorfismos de un solo nucleótido de secuencias de siete loci de genes de mantenimiento (*housekeeping*), sigue siendo útil en estudios de tipificación (Larsen *et al.*, 2012).

Dentro del serotipo Typhimurium, el más abundante a nivel mundial, se ha reportado que la secuencia tipo fundadora de este genotipo es la ST19 (Atchman *et*

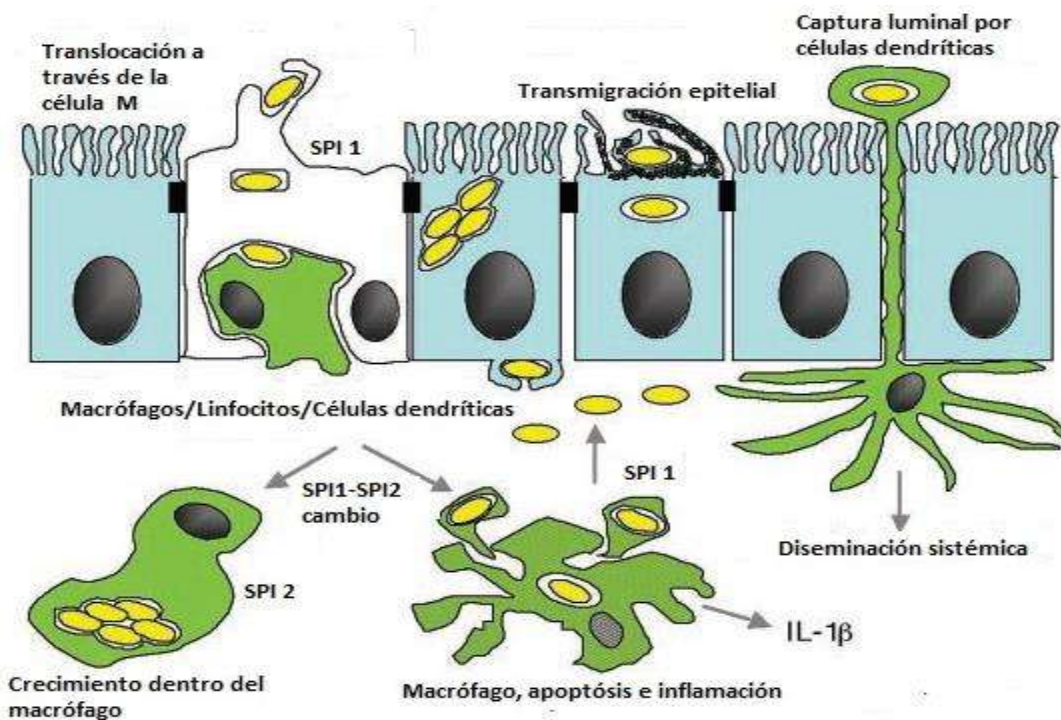
*al.*, 2012). Sin embargo, recientemente se han descrito fenómenos de desplazamiento del genotipo fundador ST19 por otros genotipos que comienzan a tener una gran relevancia epidemiológica. En África Sub-sahariana, por ejemplo, se ha reconocido al 90% de los aislados de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium como genotipo ST313, generando infecciones invasivas de manera prevalentemente en esta región (Branchu *et al.*, 2018). Dicho genotipo también se ha aislado en Inglaterra y Gales, asociándose aquí a infecciones gastrointestinales (Ashton *et al.*, 2017). Otro ejemplo relacionado a este desplazamiento se reportó en Shenzhen, China, en donde durante el periodo de 2010 a 2014 se obtuvieron 240 aislados de *Salmonella* Typhimurium (33 en alimentos y 207 clínicos), encontrando que el 69.58% era del genotipo ST34 y el 23.75% del ST19. Además, un porcentaje significativo de los aislados ST34 (72.46%) presentó una gran capacidad de formar biofilm, así como resistencia a múltiples fármacos (Li *et al.*, 2017).

En México, se detectó por primera vez al genotipo ST213 en distintas regiones del país tanto en aislados clínicos humanos como de alimentos (Wiesner *et al.*, 2009) y se determinó como el más abundante en los estados de Yucatán, Michoacán, San Luis Potosí y Sonora; desplazando al genotipo fundador (ST19). Además, en este mismo estudio se identificó al genotipo ST213 con un fenotipo de multidrogorresistencia a antibióticos en nuestro país (Wiesner *et al.*, 2011).

## **2.4 Patogenicidad**

*Salmonella enterica* se transmite por vía fecal-oral generalmente a través de los alimentos. Puede llegar a sobrevivir a la acidez del estómago y la osmolaridad del intestino delgado; induce su internalización por las células epiteliales intestinales del íleon y resiste la fagocitosis por los macrófagos, favoreciendo la colonización del tejido linfoide subyacente y los ganglios mesentéricos (Cossart *et al.*, 2004). Los macrófagos se consideran las células blanco de la infección, ya que la bacteria se establece en un compartimiento ácido conocido como vacuola, donde es capaz de evadir la actividad lítica de los componentes lisosomales, multiplicarse y propagarse en el tejido intestinal o en el resto del organismo de su hospedero

cuando se establece una infección local o sistémica, respectivamente (Haraga *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Estrategias de invasión de *Salmonella enterica* (imagen modificada de Cossart *et al.*, 2004).

Varios serotipos de *Salmonella* no tifoidea (p. ej., Typhimurium, Dublin, Choleraesuis) tienden a tener más posibilidades de causar infecciones extraintestinales que otros. En particular, cepas de la Secuencia Tipo 313 (ST313) de *S. Typhimurium*, se asocian con enfermedad invasiva (Leekitcharoenphon *et al.*, 2013; Gal-Mor *et al.*, 2014). Otros factores de riesgo importantes para la enfermedad invasiva, además del VIH, son la coinfección con la malaria y la malnutrición. A diferencia de la fiebre entérica, las personas infectadas con *S. enterica* no tifoidea presentan gastroenteritis aguda y diarrea acuosa autolimitada. La náusea, los vómitos, el dolor abdominal y la fiebre también son síntomas comunes. Los síntomas aparecen de 6 a 12 h después de la ingestión del patógeno y los síntomas clínicos duran menos de 10 días (Gal-Mor *et al.*, 2014). La dosis infectiva de *S. enterica* es de aproximadamente de  $10^6$  células capaces de producir enterotoxinas en la mucosa del intestino delgado (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011).



El resultado clínico de la infección por *S. enterica* depende en gran medida del serotipo involucrado y del estado inmunológico del individuo. *S. enterica* interactúa inicialmente con las células epiteliales, que pueden reconocer bacterias patógenas e inducir una respuesta inflamatoria reclutando distintas células fagocíticas (Kaiser *et al.*, 2011). La respuesta inmune temprana implica el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en las células M de las placas de Peyer del intestino, generando un proceso inflamatorio y favoreciendo el retraso de la propagación de las bacterias a los tejidos sistémicos (Tam *et al.*, 2008). Los neutrófilos y las células NK desempeñan un papel importante en la etapa inicial de la infección al generar IFN- $\gamma$ ; además, monocitos inflamatorios pueden producir enzimas productoras de óxido nítrico como iNOS y citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en la zona afectada (Pham *et al.*, 2015). Los macrófagos residentes en los tejidos infectados también pueden fagocitar a las bacterias y activar la caspasa-1 e inducir citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Miao *et al.*, 2006).

## **2.5 Factores de virulencia**

Dentro del hospedero, los genomas de las bacterias entéricas se encuentran bajo intensa presión selectiva debido a factores que incluyen la competencia con la microbiota residente del tracto digestivo, la fluctuación cualitativa y cuantitativa en las fuentes de nutrientes y del medio ambiente, así como la presión del sistema inmune del hospedero, entre otros. Por ello, es de esperar que los genomas de las bacterias entéricas muestren “marcas” de estas presiones y esto se vea reflejado en la presencia de genes individuales o bloques de genes que, en conjunto, potencian la capacidad patogénica de las bacterias. Se ha observado que frecuentemente dichos genes muestran un contenido de GC que difiere respecto al resto del cromosoma. Esto sugiere que probablemente los genes involucrados han sido adquiridos de manera independiente por un evento horizontal de transferencia de genes. De hecho, estos genes se asocian frecuentemente con genes de plásmidos, propiciando la adaptación o modificación de la capacidad patogénica de la bacteria y dichos bloques de genes asociados a virulencia son denominados “Islas de patogenicidad” (Baker y Dougan, 2007).

Los genes de virulencia ubicados en las islas de patogenicidad juegan un papel crucial en la patogénesis de las infecciones ocasionadas por *S. enterica*. Las islas de patogenicidad de éste patógeno contribuyen a la invasión de la célula hospedera y a la patogénesis intracelular. En la actualidad, se han descrito 12 islas de patogenicidad entre las que se comparten algunas regiones, aunque el tamaño, la estructura y su función, así como la distribución en subespecies y serotipos, pueden ser marcadamente diferentes (Hensel, 2004). La virulencia de *S. enterica* depende en parte de su sistema de secreción tipo III codificado en la isla de patogenicidad Tipo 2 (Jennings *et al.*, 2017); estos sistemas son estructuras con analogía a jeringas mediante las cuales se secretan las proteínas efectoras que ayudan al patógeno a invadir células humanas o de animales.

La isla de patogenicidad Tipo 1 está relacionada con la invasión de células no fagocíticas mediante un proceso que involucra la modificación del citoesqueleto o "*ruffling*". También participa en el proceso de replicación intracelular, interviene con la respuesta inmune del hospedero y algunos genes dentro de esta se relacionan con la formación de biofilm (Barreto *et al.*, 2016). En la isla de patogenicidad Tipo 1 se encuentran los genes *sopE*, *avrA*, *invA*, *invH*, *sipA*, *sipB*, *sipC*, *sipD*, los cuales determinan la penetración de la bacteria a la célula epitelial. Los genes *invA* y *sopE* modifican el citoesqueleto de actina de la célula epitelial para facilitar la invasión. En las Islas de patogenicidad 2 a la 5 se encuentran los genes *ssaQ*, *rmbA*, *spi4-F* y *sopB*, involucrados en la replicación intracelular y el crecimiento en el interior de las células epiteliales y macrófagos, para su posterior infección sistémica (Saldarriaga *et al.*, 2000; Chaudhary *et al.*, 2015).

### **2.5.1 Plásmido de virulencia**

Distintos serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* albergan un bajo número de copias de plásmidos de virulencia, los cuales tienen un tamaño variable de 50 a 90 kb (Lobato-Márquez *et al.*, 2016). El plásmido de virulencia de *Salmonella* Typhimurium, denominado pSLT, no se encuentra en otros géneros distintos de *Salmonella* y es considerado serotipo específico para *S. Typhimurium*. Se ha reportado que en su forma más común tiene un tamaño de 94 kb (Hiley *et al.*, 2019). Se presume que la transmisión del plásmido pSLT se lleva a cabo de forma vertical

sólo entre serotipos de *S. enterica*, debido a que éste parece no moverse horizontalmente entre otras bacterias (Silva *et al.*, 2017). El plásmido pSLT posee algunos genes relacionados con la virulencia, como el operón *spV*, mientras que otros están implicados en la adhesión por medio de fimbrias, como los genes *pefC* y *rck*, este último involucrado en la evasión de la respuesta inmune mediante la destrucción del complemento (Mendoza *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Mapa físico del plásmido de virulencia pSLT AE006471 de *Salmonella Typhimurium* (imagen modificada de Hiley *et al.*, 2019).

## 2.6 Resistencia a estrés

### 2.6.1 Resistencia a estrés ambiental

Aunque el tracto digestivo es el hábitat natural de *S. enterica*, este patógeno infecta a su hospedero mediante la ingesta de comida contaminada, por lo que puede

permanecer por periodos prolongados de exposición al ambiente fuera del tracto digestivo, durante los cuales enfrenta cambios súbitos en las condiciones fisicoquímicas del entorno. Este ambiente puede ser tanto natural, incluyendo suelo y cuerpos de agua, como comercial, que abarcaría plantas de procesamiento de alimentos, rastros, refrigeradores de comercios, entre otros (Winfield y Groisman, 2003). En dichos ambientes los cambios de pH, osmolaridad, temperatura, humedad y radiación, son constantes. Determinados serotipos de *S. enterica* pueden enfrentar exitosamente la amplia gama de condiciones de estrés presentes en los microambientes naturales, comerciales y del hospedero (Kenyon y Spector, 2011; Rychlik y Barrow, 2005).

Se ha documentado que algunos serotipos de *S. enterica* pueden sobrevivir a temperaturas de 6°C (Humphrey *et al.*, 2011), e incluso al estrés generado por una condición de calor subletal de 42°C (Sirsat *et al.*, 2011). Además, este patógeno sobrevive en alimentos con baja disponibilidad de agua como cáscaras de almendras secas, mantequilla de cacahuete, leche en polvo, polvo de cacao, nuez y productos de alimentación de las aves de corral, durante largos periodos de tiempo (Margas *et al.*, 2014). La alta capacidad de respuesta que muestran distintas variantes de este patógeno se debe en parte a reguladores transcripcionales que responden a estímulos específicos y desencadenan una cascada de señalización para contrarrestar el estrés. Las tensiones ambientales que dañan la membrana externa o interrumpen la homeostasis periplásmica de bacterias Gram negativas, conducen a la estimulación de la envoltura de respuesta al estrés (Appia-Ayme *et al.*, 2011).

En estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, cepas de *S. enterica* Typhimurium de los genotipos ST19 y ST213 se expusieron durante ocho días a condiciones asociadas a la preservación de alimentos, como actividad de agua reducida ( $a_w$ ), pH ácido y temperatura de refrigeración. Se determinó que las cepas ST213 presentaron mayor porcentaje de viabilidad que la ST19 a pH 3.5 en refrigeración. Sin embargo, en la misma condición de estrés a temperatura ambiente, la viabilidad de tres cepas de los genotipos ST213 fue menor que la de ST19. También se observaron diferencias intragenotipo en las cepas ST213 para resistir las condiciones de  $a_w$ , tanto en refrigeración como a temperatura ambiente,

en las que dos cepas ST213 tuvieron mayores porcentajes de viabilidad en comparación con el genotipo ST19 (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019). Por otro lado, se evaluó la capacidad de recuperación post-estrés durante 6 h y se observó que las cepas 115 y 196 (ambas ST213) entran más rápido en fase exponencial para la mayoría de condiciones de estrés probadas en comparación con las demás cepas. Para las condiciones de  $a_w$  (4°C), pH (4°C) y pH ( $T_{amb}$ ) las cepas tardaron más en entrar a fase exponencial (4 h). No así para la condición  $a_w$  ( $T_{amb}$ ) que desde las 2 h de recuperación la mayoría de cepas entraron en fase exponencial, siendo esta condición la que fue más letal para las cepas durante el estrés. En conclusión, se determinó que el genotipo ST213 de *S. enterica* tiene mayor resistencia a condiciones adversas cuando está en refrigeración en comparación con ST19; sin embargo, cuando están en refrigeración tardan más en entrar en crecimiento exponencial todas las cepas probadas de ambos genotipos, posiblemente debido a la activación de genes asociados a resistencia a estrés (*rpoS*, *rpoE*), en lugar de genes asociados a crecimiento y replicación (*rpoD*) por efecto de la temperatura (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019).

### **2.6.2. Resistencia a estrés y daño celular dentro del hospedero**

Además del estrés ambiental fuera del tracto digestivo, *S. enterica* está expuesta a una serie de ambientes estresantes durante su ciclo de vida dentro del hospedero. En el proceso de colonización intestinal, *S. enterica* se expone al pH ácido del estómago, a la actividad detergente de las sales biliares, a la disminución del suministro de oxígeno, a la presencia de múltiples metabolitos producidos por la microbiota intestinal y, finalmente, a péptidos antimicrobianos catiónicos presentes en la superficie de las células epiteliales (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011). Se han descrito cuatro reguladores principales que controlan las respuestas de estrés en *S. enterica*, los cuales son RpoS, PhoPQ, Fur y OmpR/EnvZ (Rychlik y Barrow, 2006). En particular, RpoS es una de las subunidades sigma que se une a la ARN polimerasa para controlar la respuesta adaptativa frente al estrés ambiental y además, contribuye a la formación de biofilm en *S. Typhimurium* (Lago *et al.*, 2017).

Una vez que *S. enterica* ingresa al hospedero, detecta un aumento en la temperatura seguido de un cambio drástico en el pH. En el estómago, el pH

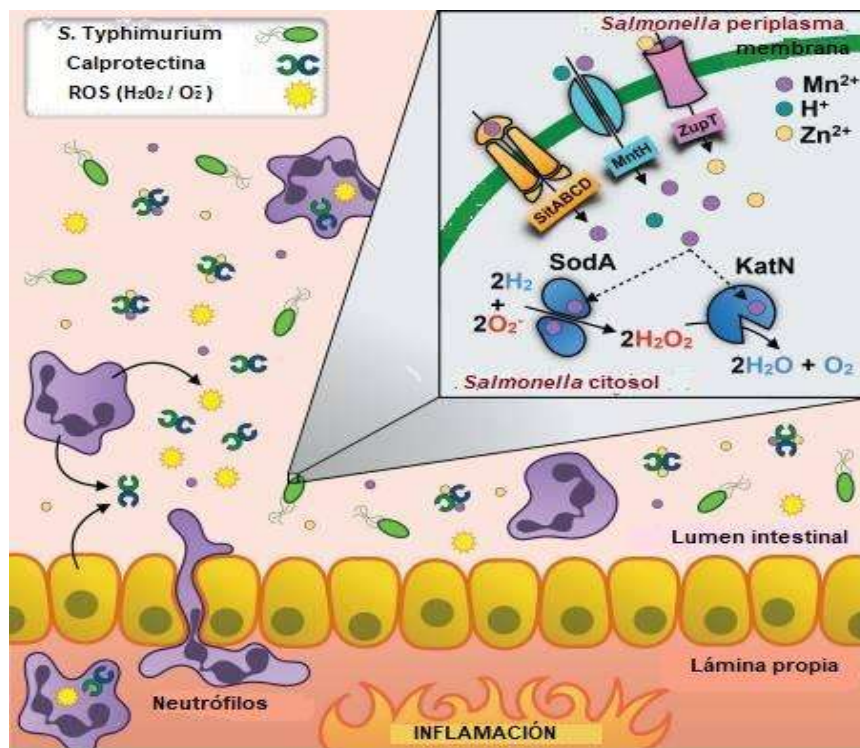
desciende repentinamente a valores que pueden aproximarse de 1 a 2. Por lo tanto, al pasar a través del estómago, es probable que *S. enterica* inicie la transcripción de genes regulados por RpoS. Dentro del intestino delgado y grueso, el pH se encuentra entre 6 y 7, ahí el patógeno se enfrenta a los subproductos de la actividad metabólica de los microorganismos que forman parte de la microbiota residente, además de las sales biliares producidas por el hígado (Rychlik y Barrow, 2006). Sin embargo, algunos serotipos de *S. enterica* expresan genes como *phoP*, *tolR* y *wec*, los cuales contribuyen a la resistencia biliar (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011). A medida que la bacteria pasa a través del intestino, la disponibilidad de oxígeno disminuye y en el intestino grueso el ambiente es esencialmente anaeróbico. Por lo tanto, los serotipos más resistentes expresan genes de proteínas como Fnr y ArcAB, que favorecen la adaptación a condiciones de anaerobiosis (Evans *et al.*, 2011). Después del paso de *S. enterica* a través del ambiente ácido del estómago y al ambiente del intestino, los microorganismos finalmente se acercan a las células epiteliales que pueden estar protegidas por agentes antimicrobianos que incluyen péptidos antimicrobianos catiónicos. Sin embargo, *S. enterica* puede responder mediante la transcripción el gen *phoPQ*, responsable de la resistencia a estos agentes (Rychlik y Barrow, 2006).

### **2.6.3. Respuesta al estrés ácido**

La acidez del estómago es una de las primeras líneas de defensa del hospedero contra patógenos transmitidos por alimentos y la resistencia al estrés ácido de estas bacterias puede contribuir a su virulencia (Berk *et al.*, 2005). *S. Typhimurium* emplea varias estrategias para evitar o reparar los daños asociados con el estrés ácido. Se han identificado dos sistemas principales inducibles de bajo pH, conocidos como respuesta de tolerancia al ácido y son clasificados en función de la fase de crecimiento en la que cada uno es inducido (Bang *et al.*, 2000). El sistema puede ser inducido bajo una condición ácida leve (pH 4.4), llamada “adaptación”, que brinda protección para crecer más a un pH más bajo, llamado “desafío”, el cual puede ser letal para células no adaptadas. Por lo cual, este sistema aumenta la supervivencia del patógeno en alimentos ácidos, en el estómago y en la vacuola que contiene a *S. enterica* (Ryan *et al.*, 2017).

#### 2.6.4. Respuesta al estrés oxidante

A su paso por el intestino, *S. enterica* genera una respuesta inflamatoria aguda que recluta en el área afectada neutrófilos y macrófagos, los cuales producen especies reactivas de oxígeno, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para matar al patógeno (Burton *et al.*, 2014). Sin embargo, el patógeno resiste el daño causado por dicha molécula y toma ventaja de esta situación, ocasionando que bacterias de la microbiota se vean afectadas por el peróxido producido por los neutrófilos, provocando que gran parte de ellas mueran (Díaz-Ochoa *et al.*, 2016). De esta forma *S. enterica* no tiene la misma competencia por nutrientes antes del estallido oxidante de los neutrófilos, que es la forma en la que suele llamarse a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (Benna *et al.*, 2016; Westerman *et al.*, 2018). En respuesta a las especies reactivas de oxígeno *S. enterica* produce enzimas para la degradación del peróxido de hidrógeno hasta oxígeno y agua. Tres de estas enzimas son catalasas (KatE, KatG y KatN) y dos de ellas alquil hidroperóxido reductasas (AhpC y TsaA) (Hébrard *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Estrategias para resistir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de *Salmonella enterica* (Imagen modificada de Díaz-Ochoa *et al.*, 2016)

### 2.6.5 Respuesta a estrés biliar

La bilis es un fluido intestinal compuesto por sales biliares que se produce a partir del colesterol, proteínas y electrolitos. Este fluido es producido por el hígado y almacenado en vesícula biliar (Hernández *et al.*, 2012). Específicamente, las sales biliares son compuestos antibacterianos que alteran la membrana de las bacterias, desnaturalizan las proteínas, causan daño oxidante en el ADN y participan en la homeostasis intestinal al controlar el tamaño y la composición de la microbiota intestinal. La resistencia a las sales biliares de algunos enteropatógenos, como *S. enterica* puede favorecer la colonización del tracto hepatobiliar ocasionando infecciones crónicas (Urdaneta y Casadesús, 2017). En la luz del intestino de los mamíferos las concentraciones de sales biliares oscilan entre 0.2% a 2% (Prieto *et al.*, 2006), mientras que en la vesícula biliar las concentraciones pueden ser mucho más altas en valores aproximados de 8%. Estos valores no son absolutos, considerando las variaciones de persona a persona, la ingesta dietética diaria, así como el estado nutricional de cada individuo (Gunn, 2000). Sin embargo, otros autores han referido que la concentración en la vesícula e intestino delgado es de 16 mg/mL (Tsai *et al.*, 2019). Ante estos compuestos antibacterianos *S. enterica* cuenta con varias estrategias para resistir o evitar los daños ocasionados por las sales biliares. Por ejemplo, *Salmonella* Typhimurium, codifica en su genoma bombas de eflujo como: *acrEF*, *mdtABC*, *mdsCBA*, *emrAB*, *mdtABC*, *mdtK* y *macAB* (Hernández *et al.*, 2015), y además de estas estrategias tiene la capacidad para formar biofilm en presencia de bilis (Tsai *et al.*, 2019). Se ha reportado que la bilis puede ser detectada por el sistema de dos componentes PhoP-PhoQ; tras la detección de la señal, PhoQ inicia una cascada de fosforilación para activar PhoP, un regulador transcripcional. La transducción de señales a través de nucleótidos cíclicos es un mecanismo ampliamente utilizado por las células, en ese sentido se ha descrito que el monofosfato dimérico cíclico de la guanosina (c-di-GMP) es un regulador central en *S. enterica* para la formación de biofilm. En *S. enterica* la celulosa es uno de los principales componentes de la matriz en el biofilm, y su producción está regulada por CsgD y la diguanilato ciclasa AdrA. Además, AdrA es



una diguanilato ciclasa responsable de la síntesis del c-di-GMP, una molécula efectora que se une y activa la síntesis de celulosa (Tsai *et al.*, 2019).

### **2.7 Internalización *in vitro* de *S. enterica* en distintas líneas celulares.**

Los modelos de cultivos celulares *in vitro* han sido de gran utilidad para comprender la interacción entre *S. enterica* y las células eucariotas. Existe registro del uso de distintas líneas celulares que permiten comprender dicha interacción. Por ejemplo, en un trabajo realizado con líneas celulares de fibroblasto de ratas y humanos (NRK-49F y BJ-5ta) se demostró que posterior a la infección, las bacterias intracelulares están rodeadas por una membrana que contiene glicoproteínas de membrana lisosomal (López-Montero *et al.*, 2016). Misselwitz *et al.* (2011) observaron la unión de las bacterias a células HeLa mediante la adhesión mediada por fimbrias.

En un estudio reciente realizado con aislados de *S. enterica* serotipo Typhimurium genotipos ST19 y ST213 obtenidos del estado de Michoacán, se evaluó la virulencia postestrés en condiciones asociadas a la conservación de alimentos. En dicho trabajo, después de mantener a las cepas durante ocho días en estas condiciones se midió su capacidad para internalizar células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2) al ser incubadas con éstas durante 2 h. Se encontró que todas las condiciones disminuyen la capacidad de internalización en las células Caco-2 y, de manera comparativa, el genotipo ST213 tiene una mayor capacidad de internalización que el ST19 en condiciones sin estrés. Sin embargo, no estimula la muerte celular, lo cual sugiere que puede sobrevivir intracelularmente. En este mismo estudio se evaluó el daño celular a células Caco-2, y se encontró que aun siendo genotipos que presentan una diferencia significativa en los valores de internalización de las células, mostraron valores de daño celular similar. Mientras que en la secreción de citocinas proinflamatorias la ST213 estimuló mayor producción de IL-6 e IL-8 en comparación con la ST19 (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019).

### **2.8 Formación de células filamentosas**

La filamentación bacteriana es una estrategia de sobrevivencia a condiciones de estrés y de fagocitosis. Su formación puede ocurrir debido a la inhibición de las

proteínas de la división celular como resultado del estrés osmótico (Stackhouse *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que *S. enterica* puede producir inhibidores de la división celular en respuesta al estrés osmótico, con el fin de obtener una ventaja de supervivencia (Finn *et al.*, 2013). Diferentes serotipos de *S. enterica* forman filamentos durante el crecimiento en condiciones hiperosmóticas, así como en ambientes ácidos durante la refrigeración de los alimentos o a temperatura ambiente (Mattick *et al.*, 2000; Humphrey *et al.*, 2011). Cabe señalar que la filamentación no es una estrategia exclusiva de *S. enterica*, también se ha observado en otros patógenos como *Escherichia coli* en presencia de concentraciones subletales de antibióticos (Bos *et al.*, 2015). *E. coli* y algunos serotipos de *S. enterica* comparten el gen *sulA*, el cual desempeña un papel central en la formación de filamentos al inhibir la proteína de división celular FtsZ (Humphrey *et al.*, 2011; Cordell *et al.*, 2003). Sin embargo, la formación de células filamentosas es una respuesta al estrés reversible, ya que una vez que el agente estresante se elimina, los filamentos se dividen rápidamente en varias células individuales (Jones *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018).

## **2.9 Formación de biofilm**

El biofilm es un consorcio de microorganismos de una o varias especies, que se encuentra embebido dentro de una matriz polimérica (Steenackers *et al.*, 2011). La formación de biofilm es una estrategia adaptativa de las bacterias, ya que el crecimiento dentro de esta estructura ofrece estabilidad, desempeña funciones catalíticas, aumenta las posibilidades de transferencia de material genético y la resistencia a los antibióticos, participa en los procesos de comunicación celular y ofrece protección para sobrevivir a las condiciones adversas y variables del medio ambiente (González *et al.*, 2018), todos ellos aspectos que contribuyen a una colonización exitosa del hospedero. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2002).

La formación de biofilm de patógenos transmitidos por los alimentos, como *S. enterica*, ha atraído mucha atención en el campo de la medicina y la industria alimentaria debido a sus riesgos potenciales, incluida la resistencia a los

antimicrobianos y la producción de factores de virulencia (Giaouris *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2011). El biofilm es una estrategia de resistencia al estrés, que puede favorecer el remplazo de genotipos, evidencia en favor de dicho fenómeno de remplazo fue documentada por nuestro grupo de trabajo, cuando se evaluó la capacidad para formar biofilm en distintas condiciones de preservación de alimentos a temperatura ambiente y en refrigeración (4°C) en acidez y agua reducida, así como en combinación de ambas. Se observó que la cepa genotipo ST213 formó biofilm bajo todas las condiciones de estrés probadas, además este fue mayor a 4°C en comparación con las demás cepas. Sin embargo, en condiciones de agua reducida y acidez a temperatura ambiente y en refrigeración, su habilidad para formar biofilm fue significativamente disminuida; mientras que la cepa genotipo ST19 no formó biofilm bajo ninguna de las condiciones ensayadas. Además, la cepa de referencia ATCC 14028 (ST19) formó biofilm sólo a temperatura ambiente en acidez. También se evaluó la viabilidad del biofilm bajo las mismas condiciones ensayadas, aunque a 4°C la actividad metabólica fue más baja en comparación con la condición de temperatura ambiente y la cepa de referencia fue metabólicamente activa sólo en acidez a temperatura ambiente (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019). Este estudio es una evidencia de que ST213 es más exitosa para sobrevivir al estrés en condiciones asociadas a la preservación de alimentos al tener una capacidad mayor para formar biofilm y además mantener la viabilidad durante ocho días.

## **2.10 Genómica poblacional de *Salmonella* Typhimurium**

En los últimos años, ha sido de interés la secuenciación de genomas de cepas clínicas y ambientales de *S. enterica*, además del estudio genómico realizado ya tradicionalmente en las cepas de referencia, particularmente de serotipos y genotipos de relevancia en salud pública. Así, se ha obtenido el genoma de una cepa del serotipo Typhimurium genotipo ST213 aislada de una muestra clínica en México, la cual presenta un tamaño de genoma de 5,088,186 pb y un contenido de G+C de 52.13%. Además, se encontró la presencia de tres plásmidos: el pIncA/C (161.5 kb) de resistencia a múltiples fármacos que contiene los genes *floR*, *tetA*, *tetR*, *strB*, *strA* y *sul2*; el plásmido pIncF que alberga el gen *bla*<sub>CMY-2</sub> de

resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido (112.6 kb) y un pequeño plásmido críptico de 4.5 kb (Silva *et al.*, 2015).

También se ha obtenido el genoma de una cepa serotipo Typhimurium genotipo ST19 aislada de heces diarreicas de un niño de tres meses y se determinó que el tamaño del genoma de esta cepa encontrada en el estado de Yucatán en nuestro país fue de 5,027,649 pb, con un contenido de G+C del 52%, comprendiendo un cromosoma de 4.9 Mb y un plásmido de virulencia (pSTV) de 94 kb. Cabe señalar que el genotipo ST213 carece del plásmido de virulencia (pSTV); sin embargo, ha sido exitoso para colonizar y propagarse. Aunque contiene el plásmido IncA/C, que le confiere resistencia a ceftriaxona, un antibiótico de cuarta generación, codificado por el gen *cmy-2* (Wiesner *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Salmonella enterica* es uno de los patógenos más comúnmente asociados a alimentos, generando 93.8 millones de casos de gastroenteritis cada año y 155,000 muertes a nivel mundial. Esto tiene un impacto importante en el sector salud y un costo económico significativo derivado de la atención a pacientes. Aunque la salmonelosis se considera una enfermedad emergente a nivel global, generalmente su impacto en salud pública es más relevante en países en vías de desarrollo. En México no se cuenta con estadísticas confiables sobre la morbi-mortalidad ocasionada por *S. enterica*, en parte debido a la falta de análisis microbiológico en la mayoría de casos de diarrea. Los estudios sobre dicho patógeno se han enfocado principalmente en identificar a los serotipos en muestras obtenidas de alimentos y en casos específicos de brotes.

Uno de los serotipos más frecuentes de *S. enterica* en México y Michoacán es Typhimurium, que además tiene gran virulencia. En México, el genotipo ST213 ha desplazado al genotipo ancestral ST19, de mayor distribución global, como el más prevalente contaminando alimentos y en muestras clínicas. Evidencia reciente sugiere el genotipo ST213 es más resistente al estrés ambiental y presenta mayor diversidad de estrategias para resistir condiciones asociadas a la preservación de alimentos que el ST19. Sin embargo, se desconoce si dicha diferencia entre genotipos también se presenta en condiciones de estrés asociadas al tracto digestivo del hospedero. Mayor resistencia al estrés del genotipo ST213, también podría implicar una mayor virulencia respecto al genotipo ST19, debido a la co-regulación transcripcional entre genes de respuesta a estrés y genes de virulencia.

Analizar las posibles diferencias genéticas, bioquímicas y fisiológicas de resistencia al estrés y virulencia entre los genotipos ST19 y ST213 es de relevancia epidemiológica y de salud pública a nivel global. Esto contribuiría a establecer estrategias de prevención y control de infecciones asociadas a la ingestión de alimentos contaminados con *S. enterica*. Además, dicho análisis permitiría un mejor conocimiento de los procesos micro-evolutivos de *S. enterica*, que dan origen a variantes con mayor virulencia.

#### **4. HIPÓTESIS**

El genotipo ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium es más resistente a las condiciones de estrés dentro del hospedero que el genotipo ST19, y dicha resistencia está asociada a una mayor virulencia.

#### **5. OBJETIVOS**

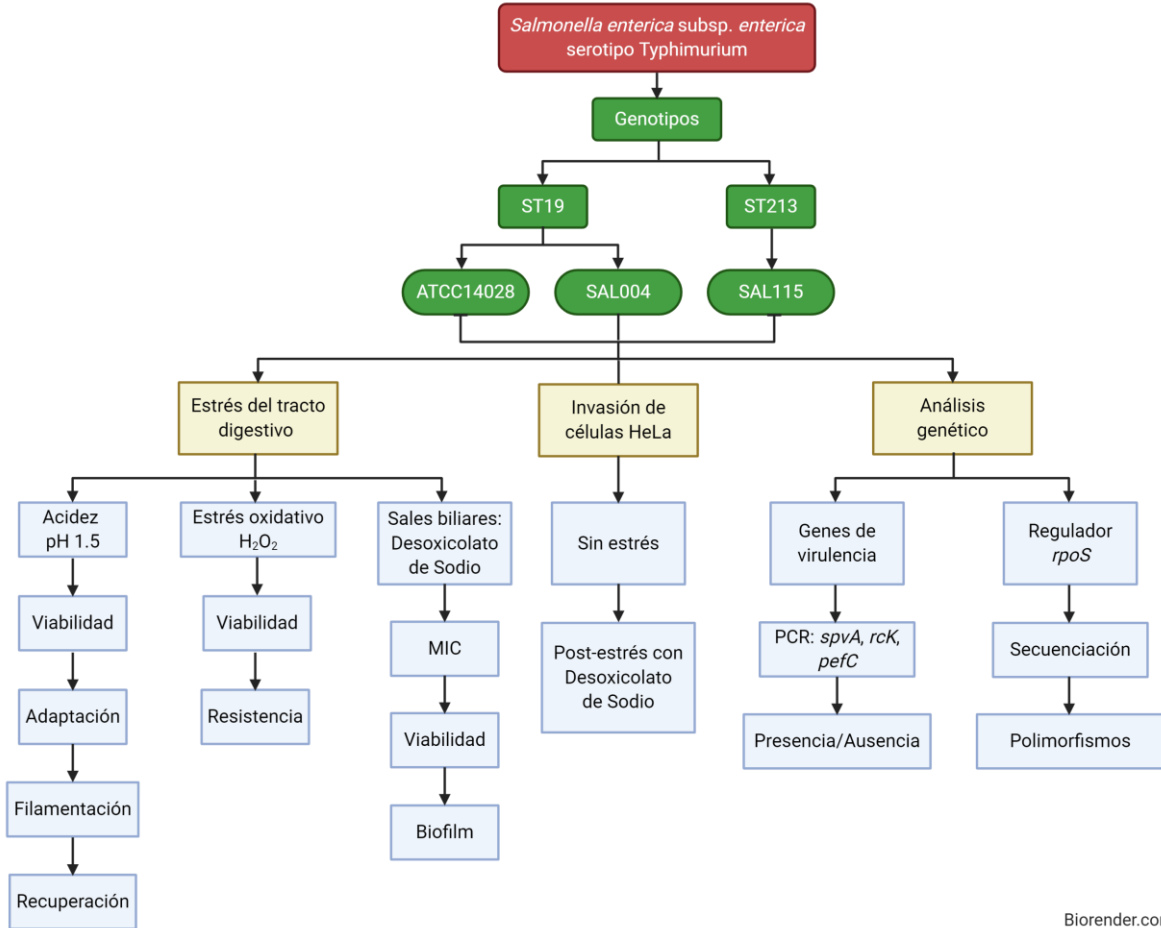
##### **5.1 Objetivo general**

Estudiar la respuesta a las condiciones de estrés dentro del hospedero y la virulencia de los genotipos ST213 y ST19 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

##### **5.2 Objetivos específicos**

- Analizar la resistencia a las condiciones de estrés asociadas al tracto digestivo del hospedero de cepas de los genotipos ST213 y ST19 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.
- Evaluar la modificación de la virulencia *in vitro* después de experimentar condiciones de estrés asociadas al tracto digestivo del hospedero de cepas de *S. Typhimurium* de los genotipos de interés.
- Identificar diferencias en regiones genéticas asociadas a la resistencia a estrés y la virulencia en cepas de *S. Typhimurium* de los genotipos de interés.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Biorender.com

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico

Se estudiaron cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium aisladas de alimentos en Michoacán, proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública. Se empleó la cepa de *S. enterica* serotipo Typhimurium ATCC14028 como referencia con fines comparativos. La información de las cepas se muestra en la Tabla 1. La Secuencia Tipo asignada (ST) fueron determinadas empleando la tipificación de *S. enterica* por *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

**Tabla 1.** Descripción de las cepas de estudio.

Cepa	Especie	Serotipo	Secuencia Tipo	Fuente de aislamiento	Municipio de aislamiento
ATCC14028	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST19	Cepa de referencia	-----
SAL004	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST19	Queso	Ciudad Hidalgo, Michoacán
SAL115	<i>S. enterica</i>	Typhimurium	ST213	Queso	Tanhuato, Michoacán

### 7.2 Medios de cultivo

El stock de cepas utilizadas se mantuvo en resguardo en agar francés a temperatura ambiente previo a los ensayos realizados; posteriormente, las cepas fueron recuperadas en caldo Luria Bertani (LB) incubándolas a 37°C durante 18 h a 130 rpm de agitación orbital, resembrándolas mediante estriado por cuadrantes en placas de agar LB.

### 7.3 Ensayos de estrés ácido

#### 7.3.1 Respuesta al estrés ácido en una escala de pH de 1 a 3

Una colonia de cada cepa se resuspendió en 15 mL de caldo LB, posteriormente se incubó durante 18 h a 37°C con agitación orbital a 200 rpm. Los cultivos obtenidos se ajustaron a una D.O. de 0.5 en el mismo volumen inicial y se desafiaron durante



60 minutos en caldo LB, ajustado previamente a un pH de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0. Al término del estrés se sembró por extensión en superficie en placas de agar LB una alícuota de 100  $\mu$ L para observar de manera cualitativa el desarrollo o no desarrollo de UFC después de incubar a 37°C, 24 h las placas de agar LB.

### 7.3.2 Respuesta al estrés ácido a un pH de 1.5

Una colonia proveniente de medio LB sólido de cada cepa se resuspendió en 15 mL de caldo LB, incubándose posteriormente a 37°C durante 18 h con agitación orbital a 200 rpm. Al término de la incubación los cultivos se ajustaron a una D.O. de 0.5 y se usó 1 mL de la suspensión resultante para obtener las diluciones seriales necesarias para realizar el conteo de UFC/mL previo al estrés. Los 14 mL restantes se centrifugaron durante 4 minutos a 3,600 x g, el sobrenadante se desechó y la pastilla resultante se re-suspendió en 14 mL de LB previamente ajustado a un pH de 1.5 para llevar a cabo el desafío ácido. Durante el desafío, los cultivos así preparados se incubaron a 37°C en reposo y se tomaron alícuotas a los 20, 40 y 60 minutos para realizar el conteo de UFC/mL, determinando así el número de células que lograron sobrevivir al estrés.

### 7.3.3 Respuesta de tolerancia al ácido

Cultivos en medio LB a 37°C en fase estacionaria se centrifugaron 4 min a 3,600 x g, el sobrenadante se descartó y la pastilla se re-suspendió en 15 mL de caldo LB a pH de 5.0, incubándose durante 18 h a 200 rpm. Al término de la incubación, se ajustó la D.O. a 0.5, y se tomó 1 mL para realizar las diluciones seriales necesarias para realizar el conteo de UFC/mL previo al desafío. Los 14 mL restantes se centrifugaron de la manera previamente descrita, se descartó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 14 mL de caldo LB a pH de 1.5, incubándose estáticamente durante 1 h. Se tomaron alícuotas a los 20, 40 y 60 minutos y se sembraron por extensión en superficie en placas de agar LB, se incubó a 37°C, 24 h y posteriormente se realizó el conteo de UFC/mL.

### 7.3.4 Formación de células filamentosas

Las cepas se sometieron a estrés como se describió anteriormente. Las células se tiñeron por Gram y se visualizaron usando un microscopio Leica® equipado con una cámara digital Leica ICC50 HD. Las imágenes se capturaron y procesaron utilizando el software Leica Application Suite 3.00. El tamaño de las células alargadas se visualizó con un aumento 100 X. Las células más largas que tres longitudes de células normales (0.7 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo) se consideraron filamentos. Se calculó el porcentaje de células filamentosas realizando el conteo de bacterias en cinco campos independientes cada uno con aproximado de 200 células.

#### 7.3.5 Ensayo de recuperación post-estrés ácido

Después del período de estrés, los cultivos de *S. enterica* se centrifugaron a 1,360 x g, posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla de bacterias fue resuspendida en 10 mL de caldo LB, incubándose a 37°C y 180 rpm. La recuperación de las cepas de estudio se monitoreó durante un lapso de 6 h tomando una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  cada 2 h para realizar las diluciones seriales necesarias que permitieran el conteo de UFC/ml en placas.

### 7.4 Ensayos de estrés oxidante

#### 7.4.1 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a una concentración de 1mM

Se siguió el protocolo de pasos de Hebrard *et al.* (2009) con algunas modificaciones. Brevemente, cultivos de 18 h de incubación se diluyeron en caldo LB a una D.O. de 0.05, después se incubaron a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.3 en un volumen final de 5 mL. Posteriormente se expusieron a una concentración de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 6 h; se realizó el conteo en placa de UFC antes y después de agregar el agente oxidante, tomando alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  cada 2 h. Se eligió la concentración descrita porque se ha reportado concentraciones de 0.25 a 1.0 mM son citotóxicas en macrófagos (Tang *et al.*, 2007).

#### 7.4.2 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a una concentración de 3 a 30mM

Cultivos de 18 h de incubación se diluyeron en caldo LB a una D.O. de 0.05, incubándose a 37°C a 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0.3 en un volumen final

de 5 mL de LB, posteriormente fueron tratados a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 3 a 30 mM, realizando lecturas de D.O. cada 2 h durante 6 h de exposición.

## **7.5 Ensayos de estrés biliar**

### **7.5.1 Determinación de concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio (DOC)**

Se siguió el protocolo de Urdaneta *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Cultivos exponenciales se ajustaron a una D.O. de 0.3 y posteriormente se agregó una alícuota de 15 µL a una placa multipozos previamente preparada con concentraciones de 0 al 14% de desoxicolato de sodio. La placa así inoculada se incubó durante 12 h y finalmente se leyó con un lector de placa la densidad óptica de cada pocillo a una longitud de onda de 595 nm. Este ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

### **7.5.2 Muerte celular ocasionada por desoxicolato de sodio (DOC)**

Cultivos en 5 mL de caldo LB, incubados durante 18 h a 37°C en condiciones reducidas de oxígeno (tapón cerrado) se centrifugaron a 100xg durante 4 min; posteriormente la pastilla de bacterias fue resuspendida en 5 mL de LB a una concentración de 6% de DOC y se llevó a incubación sin agitación a 37°C durante 30 min. Esta concentración se eligió considerando la MIC determinada en la cepa de referencia; además de que esta concentración se encuentra dentro del rango de concentraciones que puede haber en vesícula biliar. Al término del estrés, se realizaron tres lavados con PBS, dejando en el último lavado un volumen de 500 µL de PBS para resuspender la pastilla y agregar 15 µL de yoduro de propidio (50 µg/mL) para teñir las células durante 30 min a temperatura ambiente y con protección a la luz. El porcentaje de bacterias dañadas se leyó usando un citómetro MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter, Brea, CA).

### **7.5.3 Formación de biofilm**

La formación de biofilm se cuantificó usando el ensayo colorimétrico de tinción con cristal violeta (Burton *et al.*, 2007) con algunas modificaciones. Las bacterias se incubaron en placas de 96 pozos en concentraciones de 0% a 14% de DOC y se

incubaron durante 48 h a 37°C. El caldo se retiró y cada pozo de la placa se lavó tres veces con 200 µl de PBS, dejando secar durante 15 min a temperatura ambiente (TA). A cada pozo se agregaron 200 µL de cristal violeta al 0.4% y se incubaron durante 15 min a TA. El cristal violeta no adherido a cada pozo se retiró y se lavó tres veces con 200 µl de PBS. La placa se dejó secar durante 15 min y se agregaron 200 µL de ácido acético al 33% para solubilizar el cristal violeta adherido a cada pozo. La placa se leyó a 595 nm mediante un lector de placa.

## **7.6 Ensayos de invasión *in vitro***

### **7.6.1 Ensayos de invasión sin estrés**

Los ensayos de invasión se realizaron usando la línea celular HeLa (ECAC No. 93021013). Como control negativo de invasión se empleó a la cepa mutante ATCC14028  $\Delta$ SPI-1, carente de la isla de patogenicidad tipo 1 (SPI-1). Las células epiteliales se sembraron en placas de 24 pozos (Costar, Corning) a una concentración de  $2 \times 10^5$  células por pozo; posteriormente fueron incubadas durante 24 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM con antibiótico. Previamente al ensayo de invasión, se realizaron dos lavados con 500 µL de PBS en cada pocillo. Las bacterias se cultivaron en medio LB durante toda la noche, en condiciones invasivas: sin agitación y en tubo cerrado; después se agregaron a una multiplicidad de infección (MDI) de 75:1 por pozo. La infección se llevó a cabo durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la infección se realizaron dos lavados con 500 µL de PBS, se agregaron 500 µL de medio DMEM con 100 µg/mL de gentamicina para eliminar aquellas bacterias que no lograron internalizar. La placa así preparada se incubó durante 90 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se realizaron dos lavados con 500 µL de PBS. Finalmente, para realizar el conteo de bacterias viables internalizadas, se lisaron las células agregando 100 µL de Tritón X-100 al 1% en PBS e incubando 10 min a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido este tiempo, se añadieron 150 µL de PBS y se resuspendió vigorosamente el volumen total de cada pozo. Por último, se realizaron las diluciones pertinentes para realizar el conteo de UFC postinfección. La tasa de invasión se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$Tasa\ de\ invasi3n\ (\%) = \frac{UFC\ 2h}{UFC\ in3culo} \times 100$$

### 7.6.2 Ensayos de invasi3n post-estr3s

Cultivos en 5 mL de caldo LB, incubados durante 18 h a 37°C en condiciones reducidas de ox3geno (tap3n cerrado) se centrifugaron a 1000xg durante 4 min; posteriormente la pastilla de bacterias fue resuspendida en 5 mL de LB a una concentraci3n de 6% de DOC y se llev3 a incubaci3n sin agitaci3n a 37°C durante 30 min. Al t3rmino del estr3s, se realizaron tres lavados con PBS y se resuspendieron nuevamente en 5 mL de LB; despu3s se agregaron a una multiplicidad de infecci3n (MDI) de 75:1 por pocillo. La infecci3n se llev3 a cabo durante 30 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al t3rmino de la infecci3n se realizaron dos lavados con 500 µL de PBS, se agregaron 500 µL de medio DMEM con 100 µg/mL de gentamicina para eliminar aquellas bacterias que no lograron internalizar las c3lulas hospedadoras. La placa as3 preparada se incub3 durante 90 min a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se realizaron dos lavados con 500 µL de PBS. Finalmente, para realizar el conteo de bacterias viables internalizadas, se lisaron las c3lulas agregando 100 µL de Trit3n X-100 al 1% en PBS e incubando 10 min a 37°C en una atm3sfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido este tiempo, se aÑadieron 150 µL de PBS y se resuspendi3 vigorosamente el volumen total de cada pozo. Por 3ltimo, se realizaron las diluciones pertinentes para realizar el conteo de UFC viables postinfecci3n. La tasa de invasi3n se calcul3 de igual manera que en el ensayo anterior con la siguiente f3rmula:

$$Tasa\ de\ invasi3n\ (\%) = \frac{UFC\ 2h}{UFC\ in3culo} \times 100$$

## 7.8 Amplificaci3n por PCR de los genes de virulencia y resistencia a estr3s

### 7.8.1 Extracci3n de ADN de los aislados bacterianos

La extracci3n de ADN se realiz3 mediante el protocolo de fenol-cloroformo (Sambrook y Rusell, 2001) el cual se describe a continuaci3n. Las colonias bacterianas se crecieron en LB s3lido y se cultivaron con ayuda de una esp3tula previamente esterilizada, se colocan en 400 µL de regulador de lisis (Tris-HCl 100

mM pH 8.0, SDS 2 %, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, agitando vigorosamente durante 10 min. A continuación, se agregaron 400 µL de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y se agitó en el vórtex durante 5 min. Se centrifugó a 1 500xg por 10 min y se transfirió el sobrenadante (fase acuosa) a otro tubo limpio. El ADN se precipitó con 1 volumen de isopropanol frío incubando 10 min a -20 °C y centrifugando a 1500xg por 10 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con 250 µL de etanol al 70 % y se dejó secar a temperatura ambiente para finalmente resuspender en un volumen mínimo de agua, aproximadamente 20 µL. La integridad del ADN obtenido se visualizó desarrollando una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (Sambrook y Rusell, 2001).

#### 7.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes de interés

Los genes *spvA*, *rcK* y *pefC* de las cepas genotipo ST19 (ATCC14028 y SAL004) y ST213 (SAL115) se amplificaron mediante PCR. La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 20 µL, usando 4 µL de buffer, 0.8 µL de oligos directo e inverso a una concentración de 0.10µM, 0.25 µL de enzima *MyTaq<sup>TM</sup> Red DNA Polymerase* (Bioline) a 0.5 U/µL, 9.15 µL de agua y 5 µL de ADN templado de cada cepa a una concentración de 30ng. Las secuencias de los oligos fueron diseñadas y proporcionadas gentilmente por el Laboratorio de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla. Las oligos utilizados fueron los siguientes:  
*pefC* F(5' GTATATTCATCCCGCCATCC 3'), *pefC* R(5' AGATAAAACGCGTGCCGTTTC 3'), *rcK* F(5' TCTGTTTTACCGCTTCACCC 3'), *rcK* R(5' TGTACCACACCACAAACCAG 3'), *spvA* F(5' GCGCAGCGAATGAATTCCTG 3'), *spvA* R(5' TGGTCTGCTGCTCACTACTC 3').

También se amplificó mediante PCR del gen *rpoS* de las cepas genotipo ST19 (ATCC14028 y SAL004) y ST213 (SAL115). La reacción se llevó a cabo a un volumen final de 100 µL utilizando los oligos F(5' ATCGCTACTATGGGTAGCAC 3' ) y R(5' CCACAAGCGTTTCGCATGAC 3') en un volumen de 5 µL cada uno a una concentración de 10µM, 1.0 µL de enzima *Taq Q5 High Fidelity* (QIAGEN, USA) a 0.5 U/µL, 20 µL de buffer, 2.0 µL de desoxinucleótidos trifosfato a una concentración de 10mM, 10 µL de potenciador Q5 Hight GC Enhancer, 53 µL de agua y 4 µL de ADN templado de cada cepa a una concentración de 30 ng.

El programa de amplificación fue el mismo para todos los juegos de oligos. Se inició con un ciclo a una temperatura inicial de desnaturalización a 98°C, 30 segundos, seguido de una temperatura de desnaturalización de 98°C durante 10 segundos y 35 ciclos iniciando a 95° C durante 15 seg, 54°C durante 15 s de alineamiento y 72°C por 2 min para la extensión. Todos los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador.

### 7.8.3 Purificación y secuenciación del gen *rpos*

La purificación del gen se llevó a cabo mediante el kit Wizard® SV minicolumns siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez extraído y purificado el gen *rpos* se envió al Laboratorio portugués *STAB VIDA* para su posterior secuenciación.

## 7.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue distinto en los ensayos realizados, se consideró el tipo de prueba estadística con base a la comparación requerida en los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos en los ensayos de estrés ácido no tuvieron una distribución normal, por tal motivo las pruebas estadísticas que se utilizaron fueron no paramétricas. Para comparar los resultados de una misma cepa en dos condiciones distintas de estrés se usó la prueba de T-student, para comprar la diferencia de una misma cepa a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno o DOC se usó la prueba de ANOVA *post-hoc* Dunnett y para comparar resultados entre cepas distintas en una misma condición se usó una ANOVA post hoc Tukey .

La totalidad de los ensayos se llevó a cabo en al menos tres ensayos independientes por triplicado y se consideró una  $p < 0.05$  como diferencia estadística significativa en todas las pruebas estadísticas aplicadas. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar (S.D.). Se utilizó el GraphPad Prism software Version 6.01 para el análisis de los datos.

**Tabla 2.** Pruebas estadísticas aplicadas en los distintos ensayos.

<b>Ensayo</b>	<b>Prueba estadística</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Resistencia a estrés ácido</li></ul>	Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ )
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tolerancia al estrés ácido</li></ul>	Wilcoxon ( $p < 0.05$ )
<ul style="list-style-type: none"><li>• Recuperación post-estrés ácido.</li><li>• Resistencia a peróxido de hidrógeno a una concentración de 1 mM.</li></ul>	ANOVA <i>post hoc</i> Tukey ( $p < 0.05$ )
<ul style="list-style-type: none"><li>• Resistencia a estrés oxidativo</li><li>• Formación de biofilm a distintas concentraciones de DOC</li><li>• Determinación de MIC de DOC</li></ul>	ANOVA <i>post hoc</i> Dunnett ( $p < 0.05$ )
<ul style="list-style-type: none"><li>• Porcentaje de muerte celular ocasionada DOC</li><li>• Ensayos de invasión</li></ul>	<i>T-student</i> ( $p < 0.05$ )



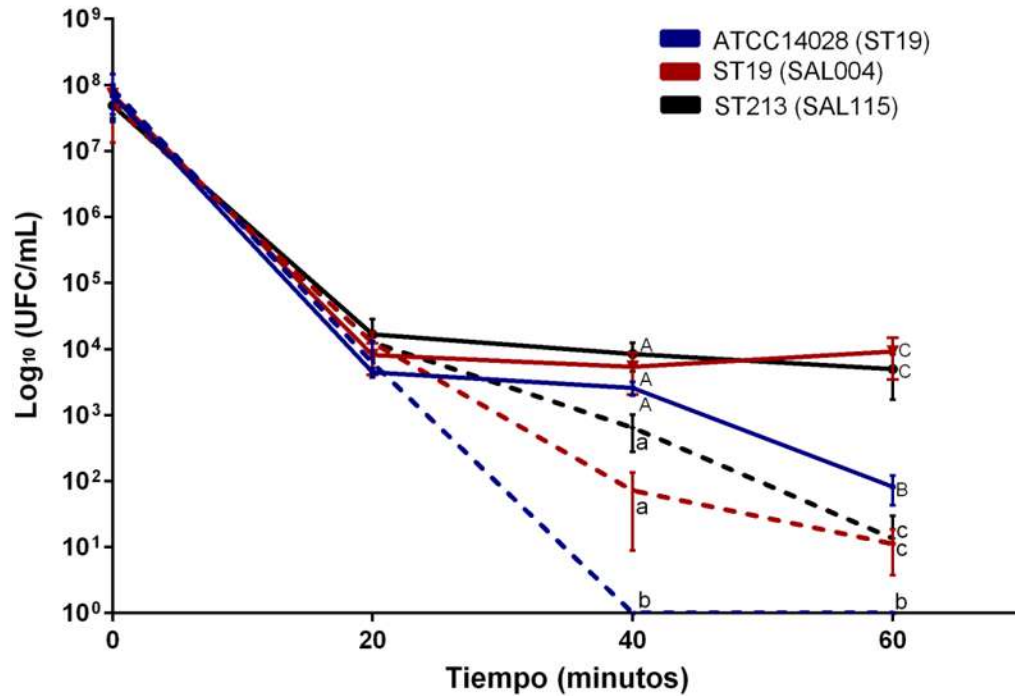
## 8. RESULTADOS

### 8.1 Resistencia a estrés ácido

Las cepas de estudio se desafiaron durante 60 min en condiciones de estrés ácido a pH de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0; siendo la condición más ácida a la que sobrevivieron a pH de 1.5. Esta condición fue letal después de los 20 min de exposición para la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) en cultivos en fase estacionaria temprana sin adaptación al ácido, previa al desafío. Sin embargo, las cepas ambientales ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115) lograron sobrevivir al menos durante los primeros 60 min de estrés; aunque su población se redujo en seis órdenes de magnitud (Figura 6).

Con base en la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, se determinó que después 20 min de estrés no hubo una diferencia estadística significativa entre las cepas. Mientras que a los 40 ( $p=0.0001$ ) y 60 minutos ( $p=0.002$ ), sí se presentó una diferencia significativa entre las cepas ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115) respecto a la cepa ATCC14028 (ST19), pero no entre ambas.

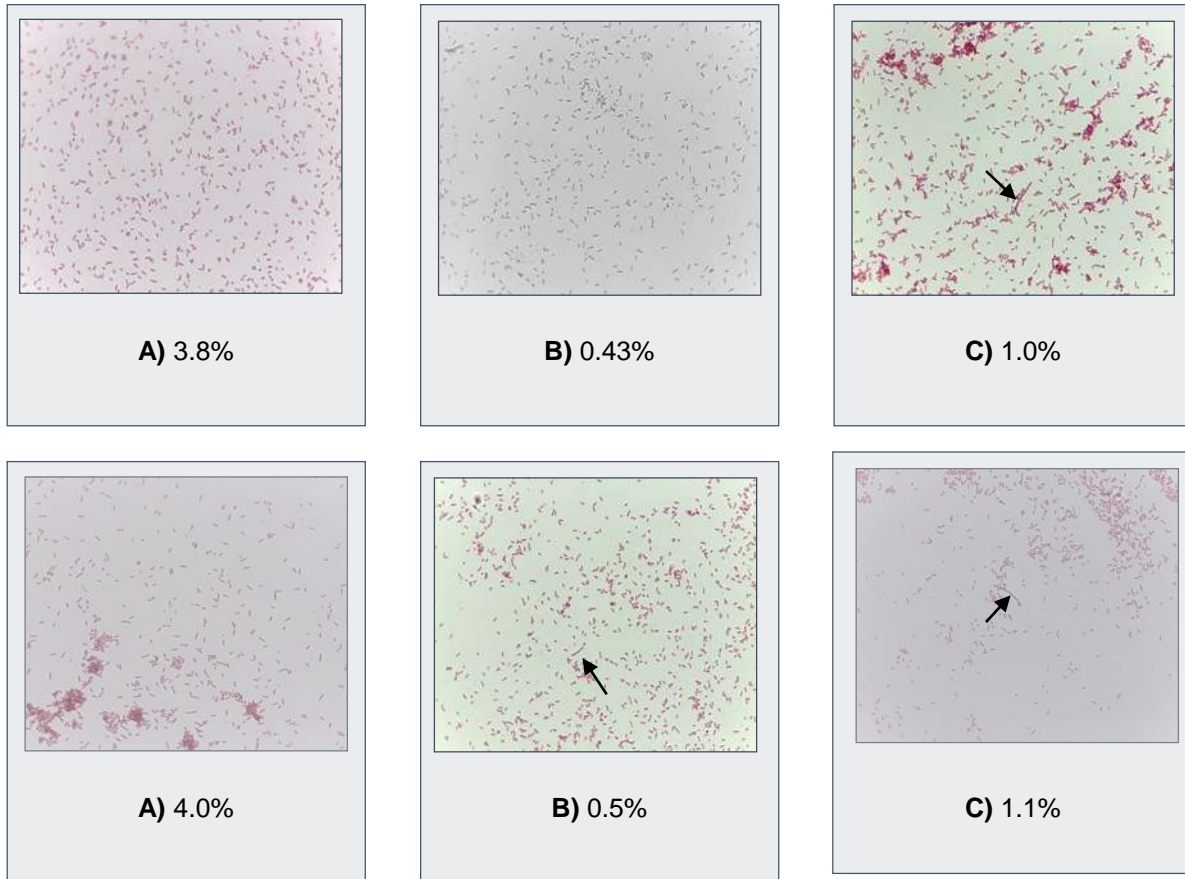
De manera interesante, también se observó que todas las cepas analizadas presentaron una respuesta de tolerancia al ácido en fase estacionaria, después de haber sido adaptadas con caldo LB ajustado previamente a un pH de 5.0; lo cual les permitió aumentar su supervivencia en comparación con aquellas que no fueron previamente adaptadas (Figura 6). De acuerdo con la prueba de Wilcoxon, comparando cada cepa respecto sí misma en distinta condición (pre-adaptadas vs no adaptadas), se determinó que a los 20 min de estrés no hubo una diferencia significativa en ninguna de las cepas de estudio. Sin embargo, a los 40 y 60 min todas las cepas presentaron una diferencia significativa, la cepa de referencia ATCC14028 presentó una  $p=0.007$ ; mientras que ambas cepas ambientales (ST19 y ST213) presentaron una  $p=0.01$ , lo cual indica que todas las cepas se adaptaron al ácido aumentando posteriormente su supervivencia a un pH menor.



**Figura 6.** Respuesta al estrés ácido de las cepas de *Salmonella enterica* de estudio. Líneas punteadas, cepas no adaptadas; líneas continuas; cepas adaptada. Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. Letras distintas representan diferencia estadística significativa. Prueba Kruskal-Wallis. ( $p < 0.05$ ) ( $n = 5$ ).

### 8.1.1 Formación de células filamentosas

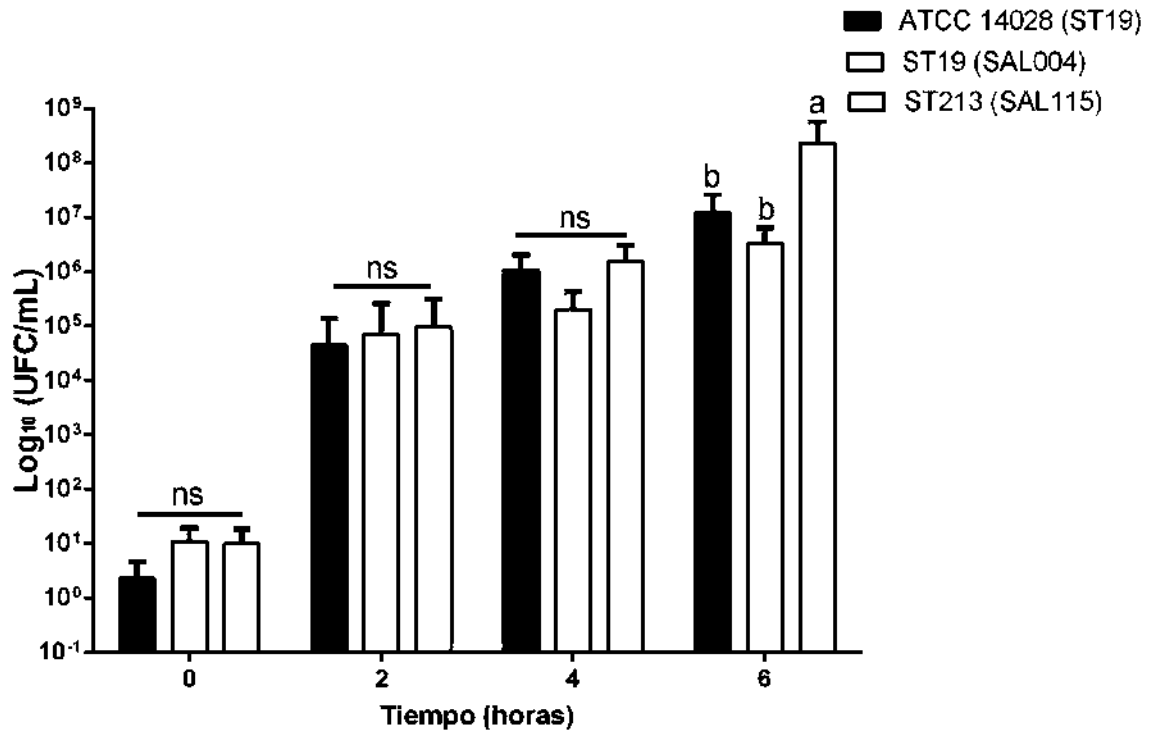
Se analizó la formación de células filamentosas de cada una de las cepas sometidas a estrés antes y después del desafío, obteniéndose porcentajes de filamentación similares, alrededor del 0.5 a 4% (Figura 7). Aunque comparando los porcentajes de filamentación entre las cepas en ambas condiciones, se observó un mayor porcentaje de filamentación en la cepa ATCC14028 (ST19) (Figura 7a), seguida de la cepa ST213 (SAL115) (Figura 7c) y en menor porcentaje la cepa ST19 (SAL004) (Figura 7b). No se observó un aumento en la cantidad de filamentos post-estrés, ni en la longitud de los mismos en todas las cepas analizadas.



**Figura 7.** Morfología y porcentajes de filamentación de las cepas de estudio previo al desafío ácido (parte superior) y post-estrés (parte inferior). Micrografía 100X que muestra: a) Cepa ATCC14028 (ST19); b) ST19 (SAL004); c) ST213 (SAL115). Las flechas señalan células filamentosas en cada campo.

### 8.1.2 Recuperación post-estrés ácido

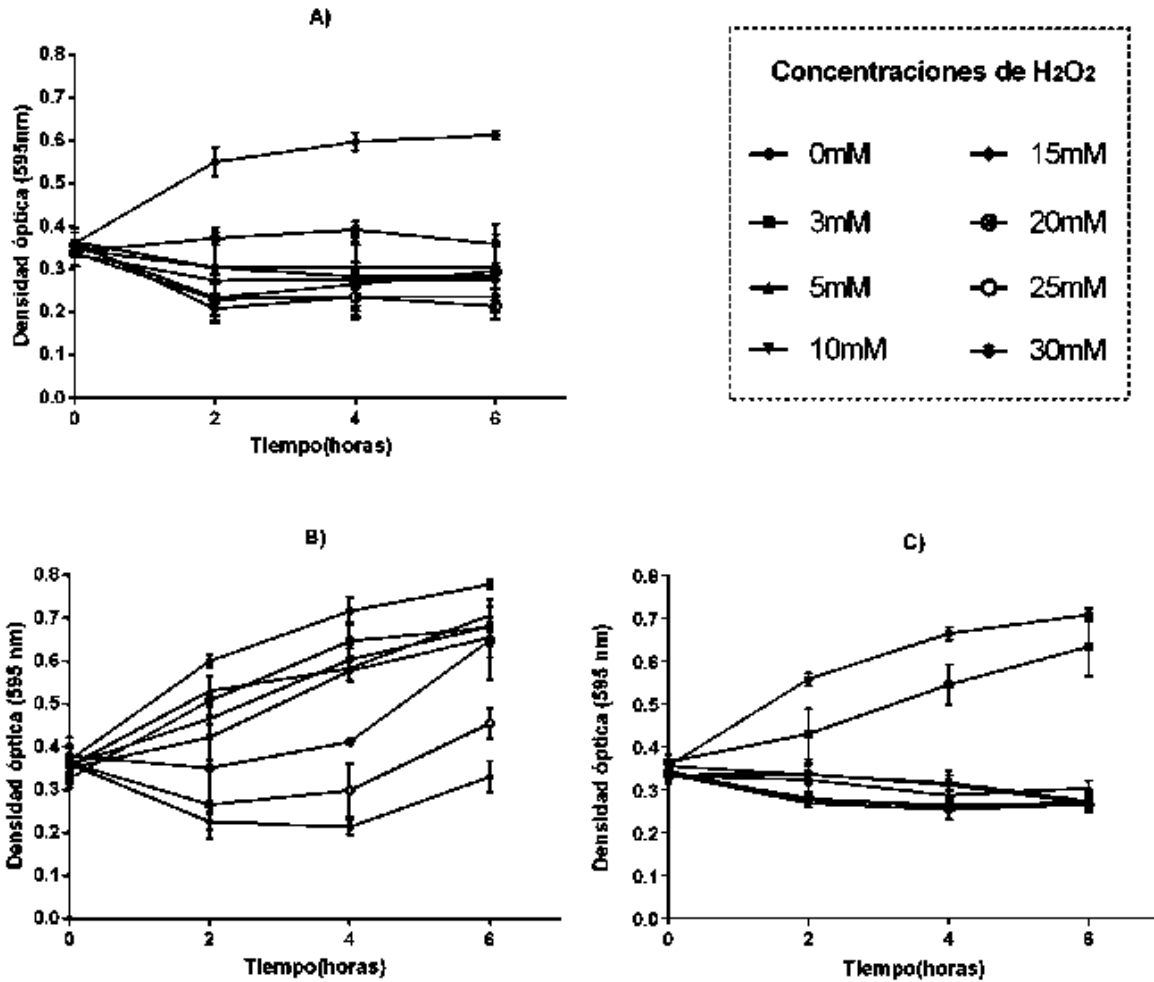
Se determinó que a las 2 y 4 h de recuperación, no hubo una diferencia significativa entre ninguna de las cepas ensayadas. Sin embargo, a las 6 h de recuperación la cepa ST213 (SAL115) mostró una diferencia significativa con respecto a la cepa ST19 (SAL004) y a la cepa de referencia, presentando conteos de  $2.1 \times 10^9$  UFC/mL, los cuales fueron mayores en comparación con  $4.2 \times 10^7$  y  $2.7 \times 10^7$  UFC/mL que tuvieron la cepa de referencia y la cepa genotipo ST19, respectivamente (Figura 8).



**Figura 8.** Recuperación post-estrés ácido de las cepas de estudio. Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. Medias con diferentes letras son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). ANOVA *post hoc* Tukey.

## 8.2 Resistencia a estrés oxidativo

Se determinó la capacidad de las cepas de estudio para resistir la exposición a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (3 mM a 30 mM). Se observó que para la cepa ATCC14028, concentraciones  $\geq 3$  mM fueron inhibitorias (Figura 9A). En contraste, la cepa ST213 presentó inhibición de crecimiento en concentraciones  $\geq 5$  mM (Figura 9C); mientras que la cepa ST19 creció en concentraciones de 0 mM a 25 mM (Figura 9B). Para determinar un crecimiento positivo se consideró al control (0 mM) como referencia, realizando un análisis estadístico mediante la prueba ANOVA *post hoc* Dunnett ( $p < 0.05$ ).

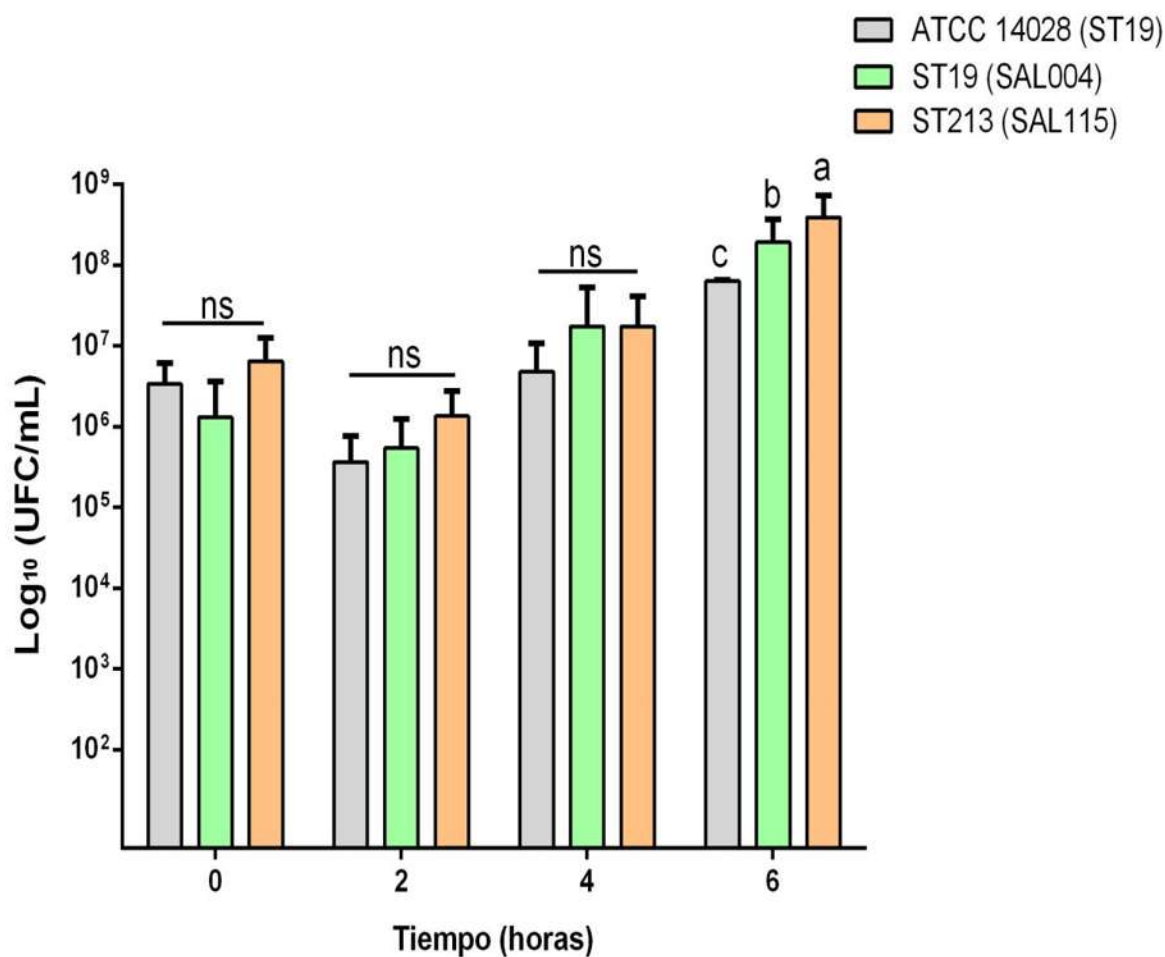


**Figura 9.** Sensibilidad de las cepas de *Salmonella enterica* de estudio a distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Paneles: A), ATCC14028 (ST19); B), ST19 (SAL004); C), ST213 (SAL115). Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. Prueba ANOVA *post hoc* Dunnett ( $p < 0.05$ ).

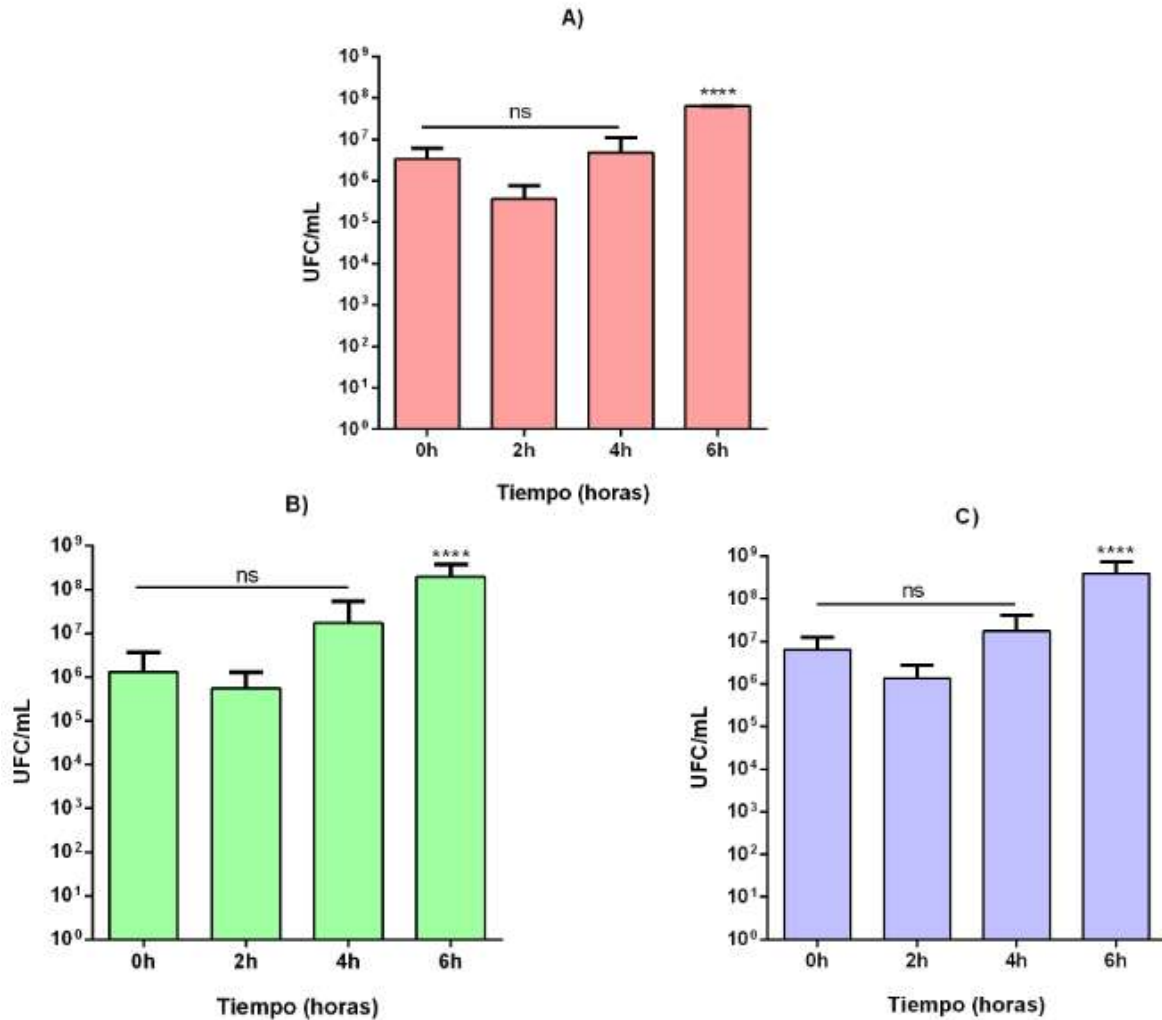
### 8.2.1 Sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 1mM

Se evaluó la sensibilidad de las cepas de interés a peróxido de hidrógeno a una concentración de 1 Mm durante 6 h de exposición y se determinó que no hubo una diferencia significativa en el conteo de UFC entre las cepas a las 2 y 4 h de exposición. Únicamente a las 6 h se observó una diferencia estadística significativa en el número de UFC, siendo la cepa ST213 la que presentó mayor número, seguida de la cepa ST19 y la cepa ATCC14028 ST19 (Figura 10). Considerando el número de UFC en el tiempo 0 y comparando éste con el conteo de UFC a las 2 h y 4 h, no hubo una diferencia estadística significativa; sin embargo, después de 6 h sí

presentaron diferencias significativas, presentando todas las cepas conteos mayores respecto el tiempo inicial. Es decir, a una concentración de 1 mM el peróxido de hidrógeno sólo retrasa el crecimiento bacteriano en un lapso de 2 h a 4 h, no así a las 6 h de exposición, en donde el conteo de UFC es mayor en todas las cepas respecto el tiempo inicial (Figura 11).



**Figura 10.** Sensibilidad de las cepas de estudio a peróxido de hidrógeno a una concentración de 1 mM durante comparadas a distintos tiempos durante 6 h comparándolas a distintos tiempos. Los datos se representan como la media ± D.E. Medias con diferentes letras son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). ANOVA de dos vías *post hoc* Tukey.

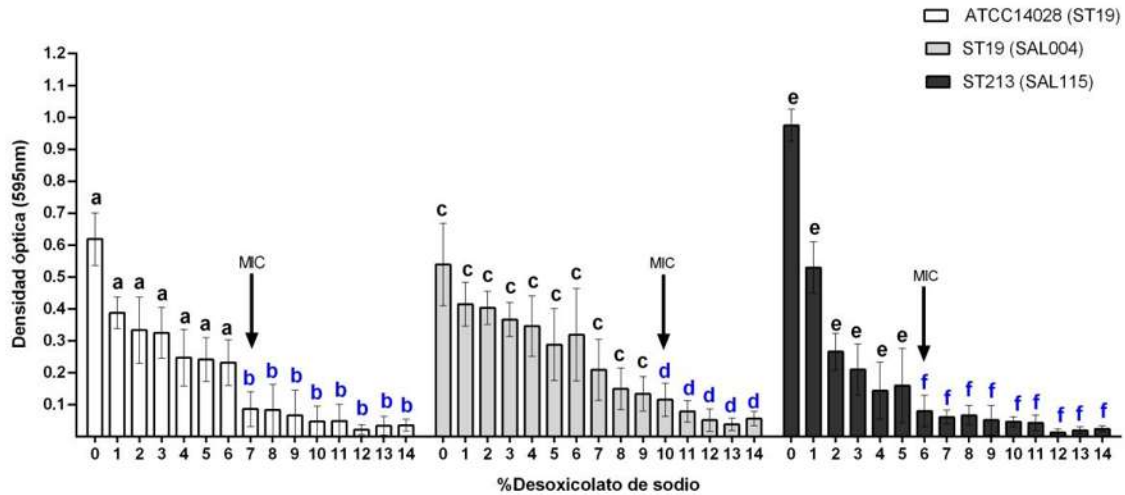


**Figura 11.** Sensibilidad de cada cepa de estudio a peróxido de hidrógeno una concentración de 1 mM. Paneles: A), ATCC14028 (ST19); B), ST19; C), ST213. Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. Medias con más de un asterisco son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). ANOVA *post hoc* Tukey.

### 8.3 Resistencia a estrés con desoxicolato de sodio (DOC)

#### 8.3.1 Concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio (DOC)

Se determinó que la concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio fue de 7% y 10% para las dos cepas de genotipo ST19, ATCC14028 y SAL004 respectivamente; mientras que para la cepa SAL115 genotipo ST213 fue de 6% (Figura 12).

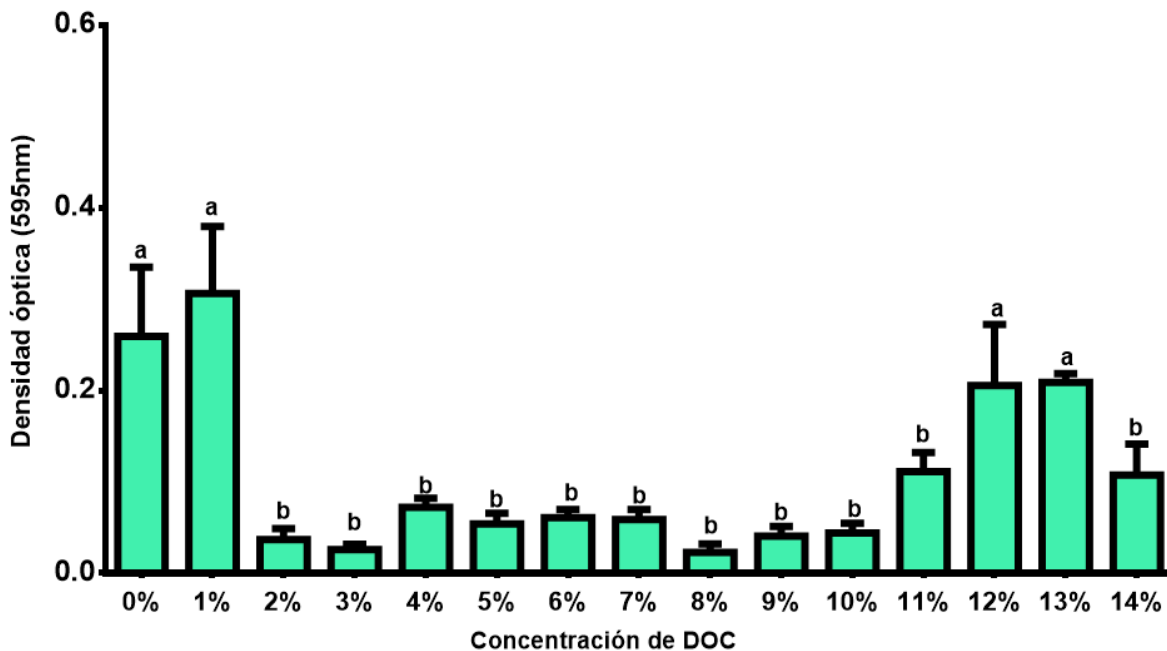


**Figura 12.** Concentración mínima inhibitoria de desoxicolato de sodio de las cepas de estudio de *Salmonella enterica*. Los datos se representan como la media ( $\pm$ D.E.) de al menos tres ensayos independientes. Letras distintas representan diferencia estadística ( $p < 0.05$ ), ANOVA *post-hoc* Dunnett.

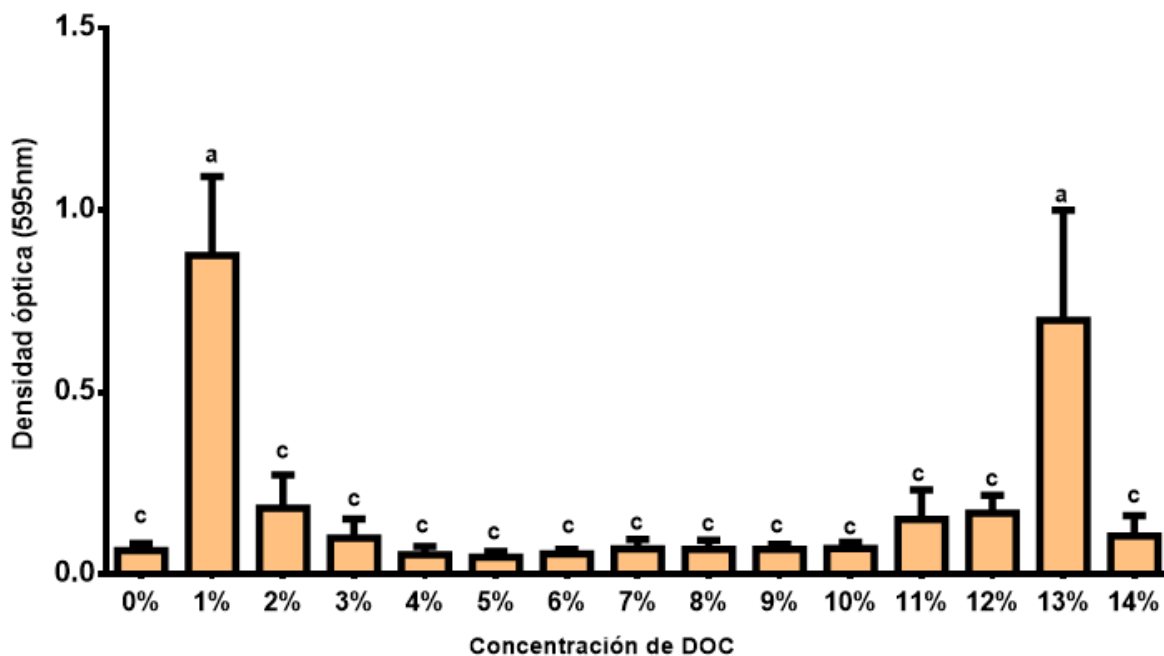
### 8.3.2 Formación de biofilm a distintas concentraciones de DOC

Se evaluó la capacidad de las cepas de estudio para formar biofilm en distintas concentraciones de DOC. Los resultados obtenidos muestran que la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) formó biofilm en el control sin DOC y en concentraciones de 1%, 12 y 13% (Figura 13). La cepa ST19 (SAL004) sólo formó biofilm a concentraciones de 1% y 13%, pero no en el control sin DOC (Figura 14). La cepa de genotipo ST213 (SAL115) formó biofilm a una concentración de 1% y en el control sin DOC (Figura 15). Se determinó que a una concentración de 1% sólo hubo diferencia estadística significativa entre la cepa de referencia ATCC14028, respecto las cepas ST19 (SAL004) y ST213 (SAL115) pero no entre estas últimas, las cuales son mejores formadoras de biofilm que la cepa de referencia. En ausencia de estrés (0% DOC) la cepa ST213 presentó una mayor capacidad de formar biofilm respecto las cepas ST19 y ATCC14028, y entre estas últimas dos cepas no hubo diferencia significativa (Figura 16).

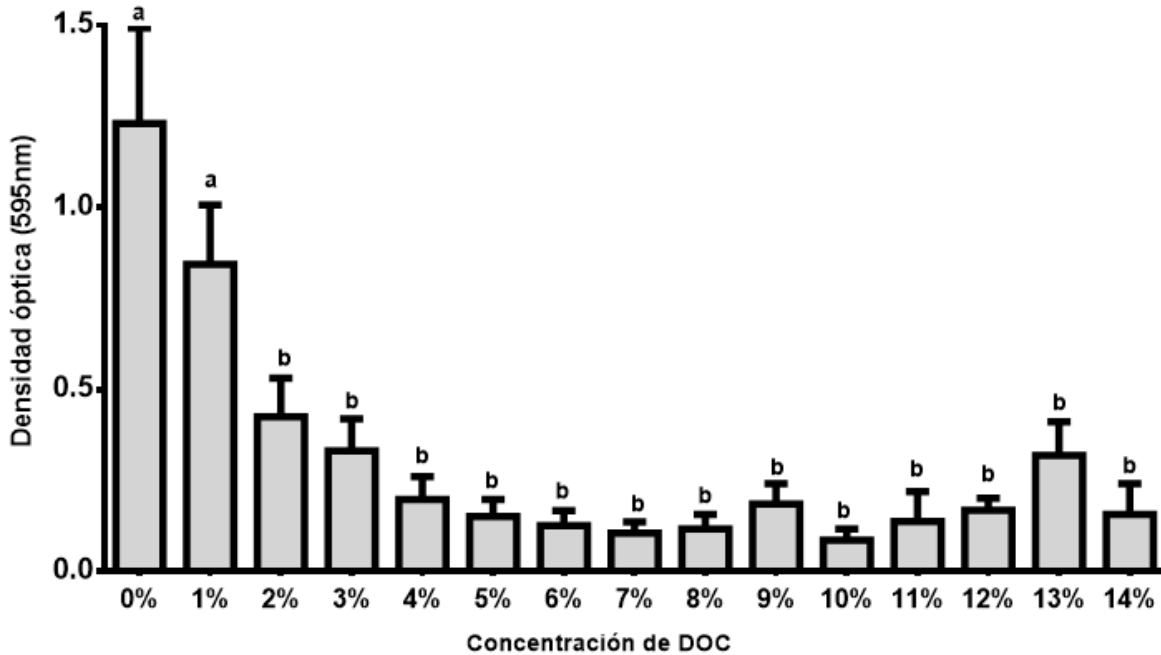




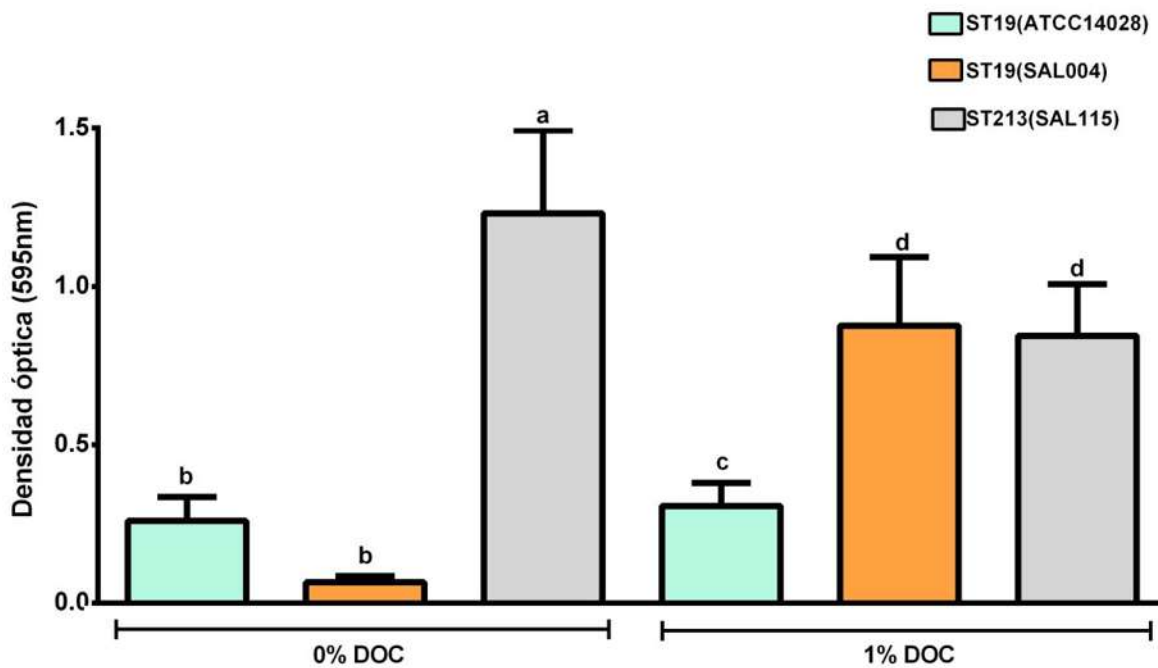
**Figura 13.** Formación de biofilm en distintas concentraciones de desoxicolato de sodio de la cepa ATCC14028 (ST19). Se muestran las medias ( $\pm$ D.E.) de tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa, ANOVA *post hoc* Dunnett ( $p < 0.05$ ).



**Figura 14.** Formación de biofilm en distintas concentraciones de DOC de la cepa ST19 (SAL004). Se muestran las medias ( $\pm$ D.E.) de tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa, ANOVA *post hoc* Dunnett ( $p < 0.05$ ).



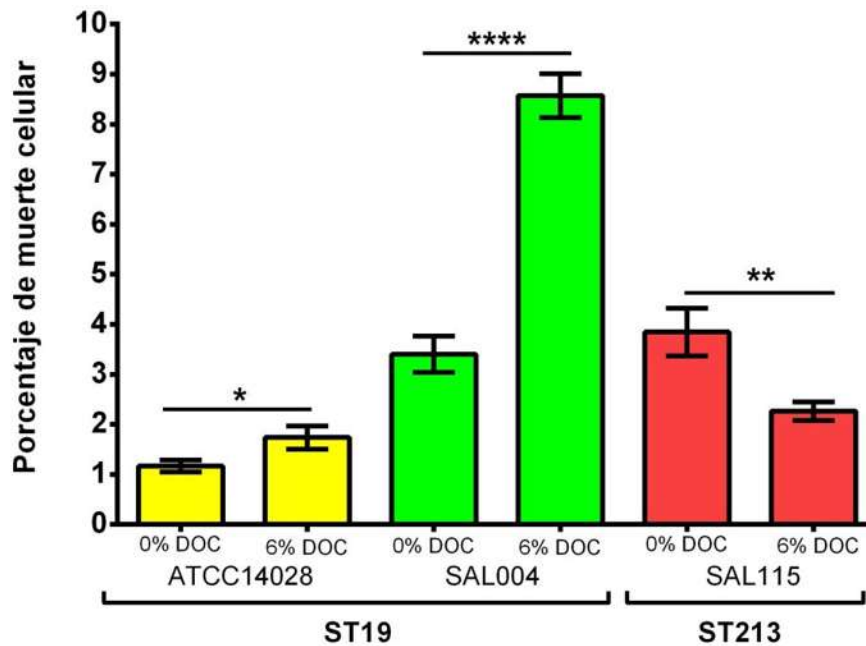
**Figura 15.** Formación de biofilm en distintas concentraciones de DOC de la cepa ST213 (SAL115). Se muestran las medias ( $\pm$ D.E.) de tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa, ANOVA *post hoc* Dunnett ( $p < 0.05$ ).



**Figura 16.** Formación de biofilm a una concentración de 1% de DOC de las cepas de estudio. Se muestran las medias ( $\pm$ D.E.) de tres ensayos independientes. Letras diferentes representan diferencia estadísticamente significativa, ANOVA *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 8.3.3 Muerte celular ocasionada por desoxicolato de sodio (DOC)

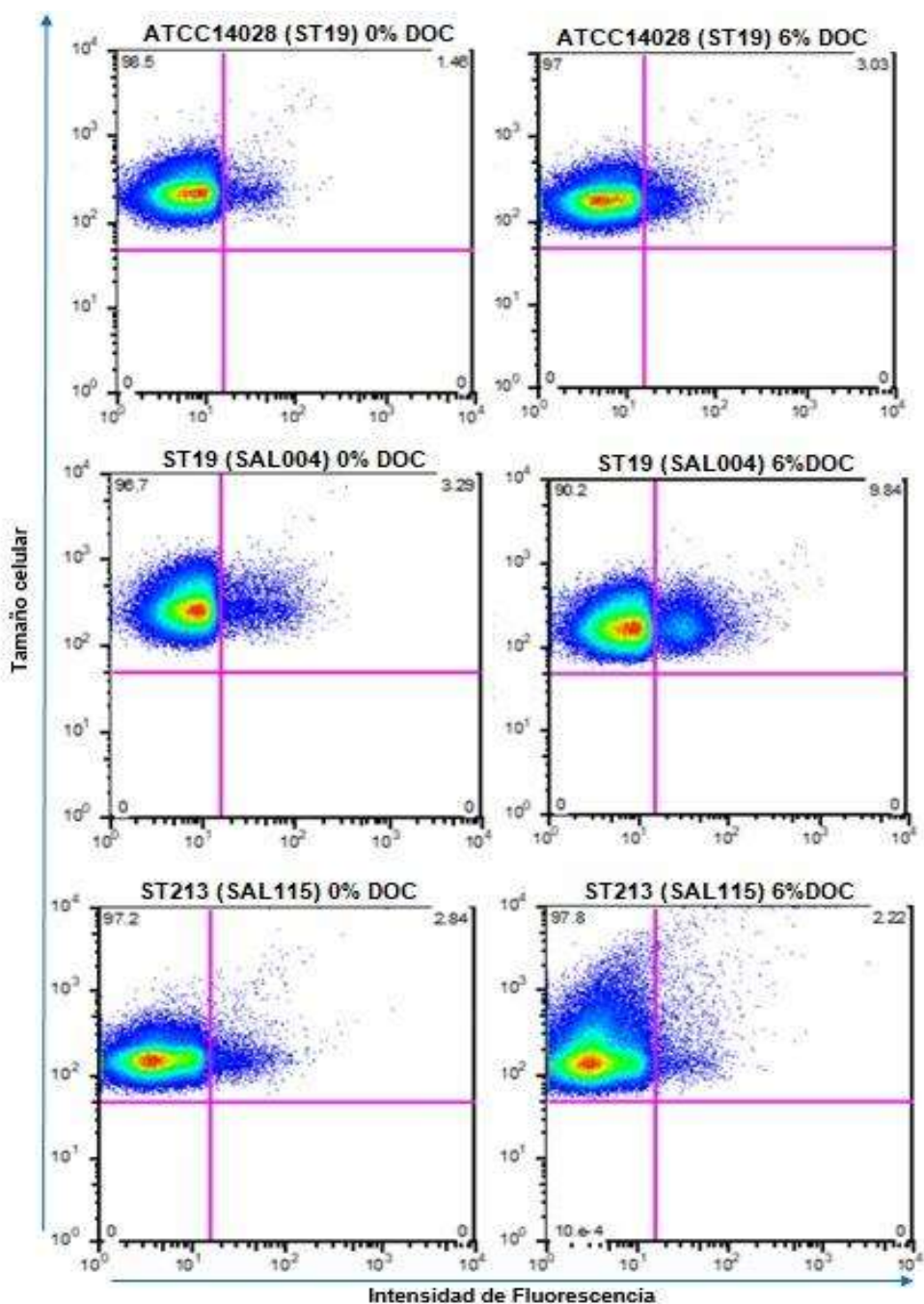
Se evaluó la muerte celular causada por desoxicolato de sodio a una concentración de 6% durante 30 min, encontrándose que en las cepas genotipo ST19 el DOC causó porcentajes de muerte significativamente mayores en comparación con el control sin DOC, siendo mayor el porcentaje de muerte causado por DOC en la cepa ST19 ambiental. Sin embargo, aunque la cepa ST213 presentó una diferencia significativa, el porcentaje de muerte a una concentración de 6% fue menor en comparación con el control sin DOC, sugiriendo que, en esta cepa, dicha concentración de DOC estimula el crecimiento leve pero significativamente, en lugar de inhibirlo o matarlo a la cepa (Figura 17).



**Figura 17.** Muerte celular ocasionada por desoxicolato de sodio a las cepas de *Salmonella enterica*. Los datos en la gráfica representan la media y la  $\pm$ D.E. del porcentaje de daño celular. El porcentaje de daño celular fue determinado con base en la lectura de 100 000 eventos, considerando células dañadas aquellas que perdieron la integridad de su membrana favoreciendo la permeabilidad del yoduro de propidio y observándose en éstas mayor intensidad de fluorescencia. Medias con uno o más asteriscos son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Prueba T-student. Indicaciones estadísticas: \* $P = 0.05$ , \*\* $P = 0.01$ , \*\*\*\* $P = < 0.0001$ .

Se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células viables y células muertas a una concentración de 6% de DOC durante 30 min de exposición. Se

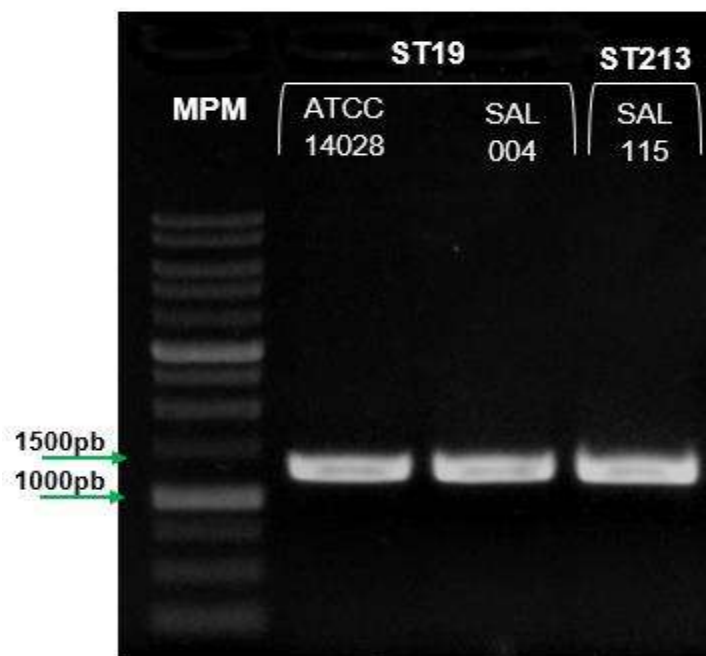
observó que la cepa ST19 (SAL004) presentó el mayor porcentaje de muerte; seguido de la cepa de referencia; mientras que la cepa ST213 (SAL115) no presentó muerte celular atribuible al DOC (Figura 18).



**Figura 18.** Imágenes representativas por cepa donde se muestra el porcentaje de células viables (cuadrante superior izquierdo) y células muertas (cuadrante superior derecho) a una concentración de 0% y 6% de DOC.

#### 8.4 Análisis del gen *rpoS*

Se llevó a cabo la amplificación del gen *rpoS*, detectándose la presencia del gen en todas las cepas de estudio (Figura 19). Se determinó la secuencia de todos los productos de amplificación obtenidos.



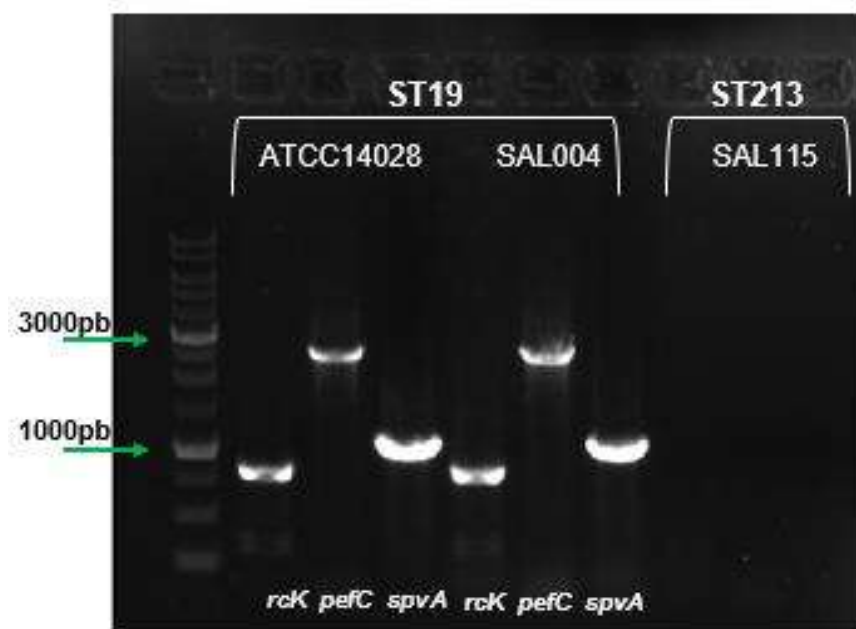
**Figura 19.** Amplificación del gen *rpoS* de las cepas de estudio. Se muestran los productos amplificados en una electroforesis en gel de agarosa. Carriles: MPM, Marcador de Peso Molecular, ST19 y ST213 amplificación del gen *rpoS*.

La secuencia del gen *rpoS* de las tres cepas analizadas se comparó con la secuencia nucleotídica de una cepa proveniente de la cepa de referencia ATCC14028 (ST19). En la cepa de referencia ATCC14028 se observó una sustitución sinónima de una citosina (C) por una timina (T) en la posición del aminoácido 158 isoleucina (Ile) y una mutación no sinónima en el aminoácido número 100 de la cepa SAL115 (ST213) (CGT[Arginina] por CAT[Histidina]); mientras que la cepa SAL004 (ST19) no presentó mutaciones en su secuencia.

#### 8.5 Amplificación de los genes *spvA*, *rcK* y *pefC*

Los genes de *spvA*, *rcK* y *pefC* se encuentran en el plásmido de virulencia pSLT, por lo que era de interés analizar su presencia en las cepas de estudio. Se observó

la presencia de los tres en las cepas genotipo ST19 (SAL004 y ATCC14028); sin embargo, sin embargo, la cepa genotipo ST213 no los presentó (Figura 20).

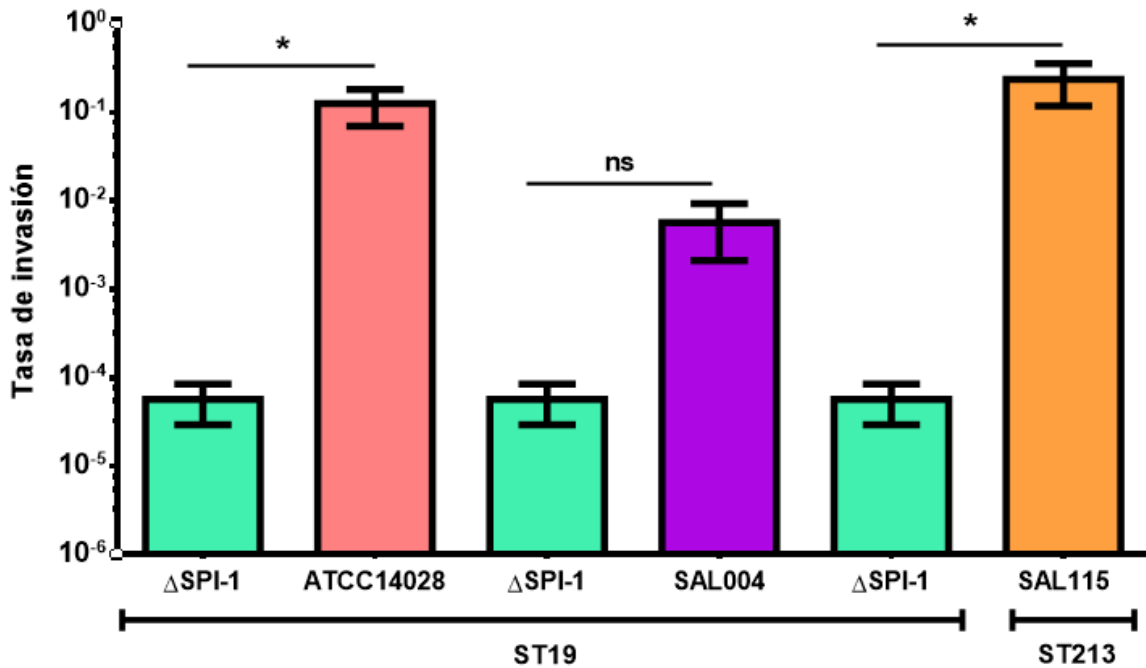


**Figura 20.** Amplificación de tres genes de virulencia del plásmido pSLT en las cepas de estudio.

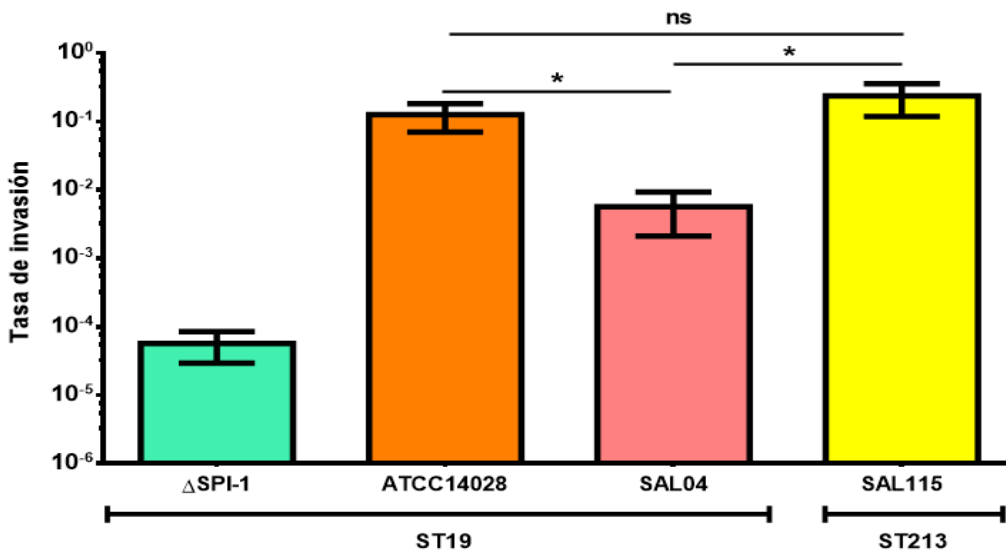
## 8.6 Ensayos de invasión

### 8.6.1 Invasión en células HeLa en condiciones sin estrés.

Se evaluó la capacidad invasiva en condiciones sin estrés de las cepas de estudio en células HeLa y se agregó una cepa mutante, carente de la Isla de Patogenicidad Tipo 1, como control negativo. Para realizar el análisis estadístico, las cepas de estudio se analizaron comparando las tasas de invasión de cada una de éstas respecto a la mutante, considerando que esta cepa es no invasiva. Se determinó que la cepa ST19 (SAL004) fue no invasiva, ya que no mostró una diferencia significativa respecto a la cepa avirulenta. Tanto la cepa de referencia (ATCC14028) como la cepa ST213 (SAL115) sí fueron invasivas, con un valor de  $P=0.0176$  y  $P=0.0257$ , respectivamente (Figura 21). Comparando las tasas de invasión de las cepas de estudio, sin considerar la cepa avirulenta, se observó una mayor capacidad invasiva de la cepa de referencia y la cepa ST213 (SAL115) respecto a la cepa ST19 (SAL004), con un valor de  $P=0.0278$  y  $P=0.0205$  respectivamente; mientras que entre ellas (ATCC14028 y ST213) no hubo una diferencia estadística significativa (Figura 22).



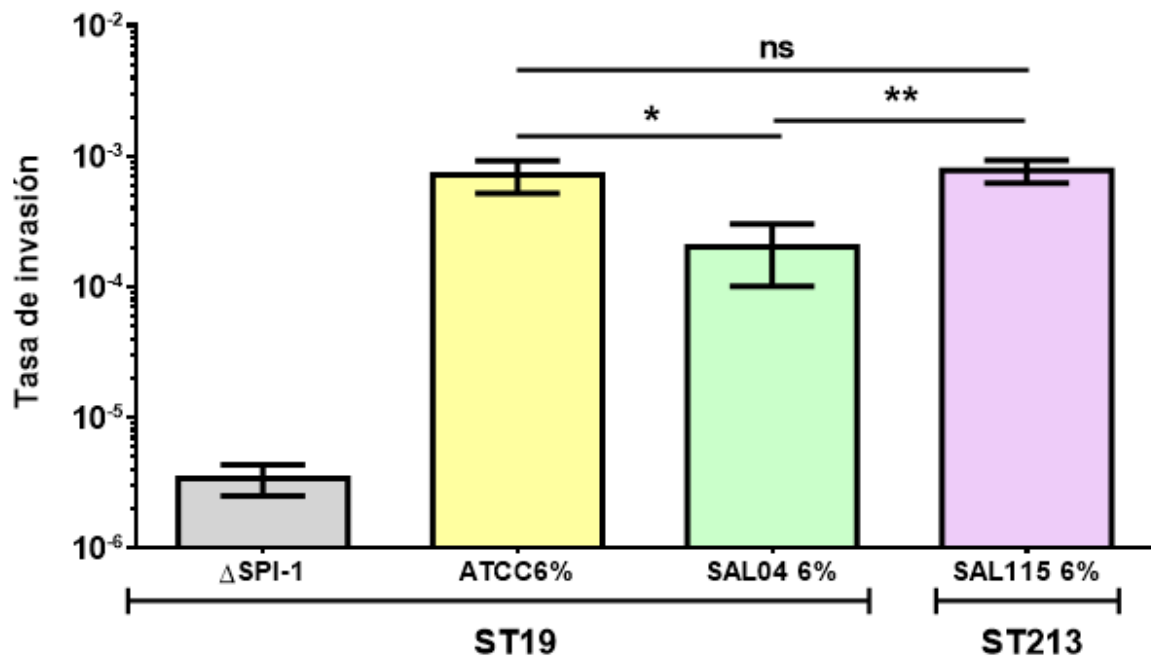
**Figura 21.** Invasión de las cepas de *Salmonella enterica* en células HeLa comparadas respecto a la cepa control negativo (ATCC14028  $\Delta$ SPI-1). Se muestra la invasión de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* en células HeLa a una MDI de 75 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. de la tasa de invasión. Indicaciones estadísticas: ns, estadísticamente no significativo; \* $P < 0.05$ ; Prueba *T-student*.



**Figura 22.** Invasión de las cepas de *Salmonella enterica* en células HeLa. Se muestra la invasión de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* en células HeLa a una MDI de 75 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media  $\pm$  D.E. de la tasa de invasión. Indicaciones estadísticas: ns, estadísticamente no significativo; \* $P < 0.05$ ; Prueba *T-student*.

### 8.6.2 Invasión de células HeLa en condiciones post-estrés a DOC

Se determinó la capacidad invasiva post-estrés a 6% de DOC de las cepas de estudio de *S. enterica*. No se encontró una diferencia estadística significativa entre la cepa de referencia y la cepa ST213 (SAL115); mientras que entre éstas (ATCC14028 y SAL115) y la cepa ST19 (SAL004) sí hubo diferencia estadística significativa, siendo la cepa genotipo ST213 la más invasiva respecto a la cepa genotipo ST19 (Figura 23).



**Figura 23.** Invasión de las cepas de *Salmonella enterica* en células HeLa en condiciones post-estrés. Se muestra la invasión de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* en células HeLa a una MDI de 75 bacterias por célula por 2 h. Los datos se representan como la media ± D.E. de la tasa de invasión. Indicaciones estadísticas: ns, estadísticamente no significativo; \*P <0.05; \*\*P<0.01; Prueba *T-student*.



## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Respuesta a estrés ácido

Los resultados obtenidos muestran una respuesta diferencial al estrés ácido entre las cepas de genotipo ST19 (ATCC/SAL004), pero no entre las cepas ambientales de distinto genotipo (ST19/ST213). Se ha reportado que el pH estomacal se encuentra en un rango de pH de 1 a 2 (Rychlik y Barrow, 2006); sin embargo, otros autores reportan valores de 1.5 a 5, seguido de un aumento inmediato hasta 6.0 después de la ingesta de alimentos (Aviles *et al.*, 2012). Cabe destacar que la matriz alimentaria, principalmente de aquellos alimentos ricos en grasas o un alto contenido en proteínas, protegen a *Salmonella enterica* de la acidez. Además, los alimentos líquidos como el agua y los jugos, por su breve vaciado, facilitan la supervivencia del patógeno, lo cual favorece que la dosis infectiva sea mucho más baja, llegando a  $\leq 100$  células (Álvarez-Ordoñez *et al.*, 2011). Por todo lo anterior, es interesante haber observado la resistencia de las cepas del estado de Michoacán a valores bajos de pH, logrando sobrevivir al menos durante 60 min a un pH de 1.5. Esto es relevante cuando se tiene en consideración que en los ensayos realizados se partió de un cultivo axénico, sin ninguna protección como la matriz de un alimento o embebidas en una matriz polimérica, como la que presentan los consorcios bacterianos en un biofilm.

Los resultados de supervivencia a estrés ácido son comparables con los reportados en estudios previos. Así, al evaluar 27 cepas de *S. Typhimurium* de muestras clínicas y 9 de alimentos, desafiando un inóculo de  $10^8$  UFC/mL durante 2 h a un pH de 2.5, Berk *et al.* (2005) encontraron que las cepas clínicas tuvieron una mayor supervivencia en comparación con las aisladas de muestras provenientes de alimentos. Aunque las cepas aquí analizadas provienen únicamente de alimentos, sobrevivieron durante 60 min, disminuyendo su población en 6 órdenes de magnitud a partir de un inóculo de  $10^8$  UFC/mL. Sin embargo, a diferencia del trabajo de Berk *et al.* (2005), las cepas del presente estudio fueron sometidas a un pH más bajo, de 1.5. Por otra parte, Lianou *et al.* (2017) evaluaron la capacidad de 30 cepas de *S. enterica* de distintos serotipos, incluyendo el Typhimurium, para sobrevivir a la acidez a un pH de 3.0, observando de manera

interesante que algunas de sus cepas exhibieron una Respuesta de Tolerancia al Ácido (RTA) induciendo su adaptación al incubarlas en un caldo LB al 1% de glucosa previo al desafío ácido (pH 3). Cabe destacar que la adaptación al ácido resultó en una mayor supervivencia en ácido para la mayoría de las cepas analizadas, pero también algunas cepas mostraron resistencia al ácido similar o disminuida en comparación con sus contrapartes no adaptadas. Específicamente, se desafiaron 11 cepas serotipo Typhimurium de las cuales sólo 6 mostraron una RTA. También analizaron a la cepa ATCC14028 de *S. Typhimurium* y observaron un comportamiento similar al encontrado en este trabajo, es decir, la cepa logró adaptarse al ácido y mostrar una supervivencia mayor, exhibiendo una RTA al igual que las cepas ambientales analizadas (ST19 y ST213). Es de relevancia destacar que este estudio es el primero en analizar la RTA entre distintos genotipos (ST19 y ST213) dentro de un mismo serotipo, en este caso Typhimurium.

En las cepas aquí analizadas también se evaluó la formación del morfotipo filamentoso, antes y después del desafío ácido. Se ha reportado que algunas cepas de *S. enterica* desarrollan dicho morfotipo en distintas condiciones de estrés, como la de acidez. Los porcentajes de filamentación fueron prácticamente iguales entre las cepas de estudio antes y después del estrés, quizá debido a que el periodo de estrés fue muy corto y la condición de acidez extrema. Así, es posible que las cepas no alcanzaran a exhibir más filamentos, o una longitud mayor en los ya existentes, invirtiendo su energía en la síntesis de proteínas de choque ácido debido a la condición tan extrema de acidez a la cual fueron sometidas. En contraste, Kumar *et al.* (2019) reportan la formación de células filamentosas a partir de las 12 h de exposición a una concentración de 20 mM de ácido pelargónico en cepas de *S. enterica* de distintos serotipos, incluyendo el Typhimurium. También se ha observado una supervivencia mayor de las células filamentosas en comparación con el morfotipo control en una condición de acidez (pH 2.0) durante 20 min (Stackhouse *et al.*, 2012).

## **9.2 Respuesta a estrés oxidante**

El peróxido de hidrógeno es producido por los macrófagos y juega un papel crucial en la defensa contra la invasión de *S. enterica*, debido a que puede penetrar las

membranas celulares, dañando las proteínas, lípidos y carbohidratos de esta (Fang *et al.*, 2016). Las cepas de *S. enterica* analizadas en el presente trabajo, mostraron variabilidad en su capacidad para sobrevivir el estrés oxidante inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así, la cepa ambiental ST19 presentó una mayor capacidad para sobrevivir y crecer en concentraciones de 3 a 20 mM de peróxido de hidrógeno. En contraste, la cepa ST213 sólo logró crecer a una concentración  $\leq 3$  mM, mientras que la cepa de referencia no logró crecer concentraciones  $\leq 3$  mM. Es posible que dichas diferencias se deban a la eficiencia catalítica de catalasas e hidropoxidasas de alquilo de las cepas analizadas, enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno. En ese sentido, Hedrard *et al.* (2009) utilizaron mutantes por delección de *S. Typhimurium* de las distintas enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno, encontrando que la cepa silvestre no afectó su crecimiento en presencia de 1 mM del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que las cepas que no poseían catalasas e hidropoxidasas de alquilo funcionales no pudieron crecer en dicha concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Alternativamente, la diferencia al estrés oxidante entre las cepas de estudio puede estar asociada a la presencia de bombas de eflujo, en particular la bomba MacAB. Dicha proteína de membrana, además de expulsar macrólidos, es inducible en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y permite la expulsión de éste. Bogomolnaya *et al.* (2013) generaron una mutante  $\Delta macAB$  derivada de *S. Typhimurium* ATCC14028, observando una drástica y rápida pérdida de la viabilidad a partir de la primera hora de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 1 mM. En contraste, la cepa complementada y la cepa silvestre no se vieron afectadas a esta concentración, continuando el curso de crecimiento durante las 5 h que fueron expuestas a dicho estrés. Por lo anterior, sería relevante en el futuro evaluar la presencia de este tipo de enzimas en las cepas utilizadas en este estudio.

Finalmente, otra posible respuesta a las diferencias en la resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las cepas podría ser una mutación en el gen *rpoS*, como se ha reportado previamente (Shah *et al.*, 2012). La proteína RpoS es un regulador transcripcional del gen *KatE*, que codifica para una enzima catalasa implicada en la degradación de peróxido de hidrógeno (Hebrard *et al.*, 2009). Por lo anterior, se obtuvo la secuencia del gen *rpoS* de las cepas de estudio, con la finalidad de identificar la presencia de las mutaciones previamente reportadas que afectan la resistencia a

peróxido de hidrógeno. Se encontró una mutación silenciosa en la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) y una mutación no sinónima en la posición 100 de la secuencia aminoacídica de la proteína putativa codificada en la cepa ST213 (SAL115), ocasionando un cambio de una Arginina por una Histidina. En el caso de la cepa ST19 (SAL004) no se identificó ninguna mutación.

Shah *et al.* (2012) evaluaron la capacidad de seis cepas de *S. enterica* serotipo Enteritidis para sobrevivir a una concentración de 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante una hora, encontrando que tres de las cepas presentaron una alta sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyendo su población aproximadamente en 90% en relación al inóculo inicial. Tres cepas mostraron una alta resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, disminuyendo su población en sólo el 10%. Al secuenciar el gen *rpoS* de las todas las cepas, encontraron que la secuencia de dos de las tres cepas resistentes al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de una cepa sensible, era 100% idéntica. Una de las cepas resistentes mostró una sustitución sinónima de G a A en el nucleótido 375, así como una mutación no sinónima en el codón 36 (AGT [Ser] a AGG [Arg]). Además, una de las cepas sensibles presentó una mutación no sinónima en el codón 126 (GGG [Gly] a GAG [Glu]). La otra cepa sensible mostró tanto una sustitución sinónima de T a C en el nucleótido 605, como una inserción de A en la posición del nucleótido 666 que originó un codón de paro interno (TAA). Dichos resultados indicaron que el codón de paro introducido en el gen *rpoS* de la cepa sensible podía estar relacionado con la alta sensibilidad al estrés oxidante generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No obstante, debido a que *rpoS* es un regulador universal de respuesta a estrés, no se descartan efectos pleiotrópicos no asociados a la regulación transcripcional del gen de la catalasa, así como la presencia de polimorfismos simples en otras partes del genoma de las cepas de estudio, que afectan de forma aun no conocida la regulación de los genes asociados a la resistencia al estrés oxidativo.

En el estudio de Shah *et al.* (2012) se midió indirectamente la actividad de *rpoS* mediante la prueba de catalasa semicualitativa, para determinar si una de las mutaciones alteró la regulación transcripcional mediada por el factor  $\sigma^S$ . Se observó que cinco de las seis cepas probadas presentaron un burbujeo vigoroso, reflejando buena actividad de catalasa. La cepa altamente sensible no presentó burbujeo, y además fue la presentó el codón de paro interno en el gen *rpoS*. Los autores

sugieren que las cepas que produjeron un burbujeo vigoroso se pueden considerar no alteradas en el gen *rpoS*, mientras que aquella cepa con un burbujeo nulo o incipiente tiene alterada la función de  $\sigma^S$ , lo que redundaría en un bajo o nulo nivel de transcripción del gen de la catalasa *KatN*. Se desconoce si el cambio de Arginina por Histidina encontrado en el regulador transcripcional RpoS de la cepa de genotipo ST213 aquí estudiada afecta su función regulatoria sobre el gen de la catalasa, lo que la vuelve más sensible al estrés oxidativo. Algo que sería interesante estudiar a futuro, al igual que posibles diferencias en el gen y la catalasa *KatN* entre ambos genotipos de interés.

En un estudio realizado por Sutton *et al.* (2000) se identificaron mutaciones en la región codificante del gen *rpoS* en 10 cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium, de un total de 27 cepas que habían permanecido en preservación en un cepario durante 34 a 45 años. Cinco de las cepas presentaban un cambio de base y sólo en una de estas se encontró mutación silenciosa, mientras que en las otras cuatro se presentaron mutaciones no sinónimas, que no condicionaron la sobrevivencia de dichas cepas. Cabe destacar que tanto las mutaciones aquí observadas en las cepas de estudio, como las identificadas en dicho trabajo previo no condicionan la supervivencia de las cepas. Sin embargo, podrían afectar la función de la proteína. Así, una explicación plausible en ambos estudios es que las mutaciones ocurrieron mientras estaban en dormancia durante el periodo de preservación en el cepario. Se sabe que las mutaciones ocurren bajo condiciones de estrés y metabolismo mínimo y que, además, se pueden generar sólo en algunas subpoblaciones (Torkelson *et al.*, 1997). Dicha posibilidad debe evaluarse con mayor detalle para conocer más a profundidad el efecto de la preservación en genes de resistencia al estrés ocasionado por las condiciones del tracto digestivo, así como de aquellos genes asociados a virulencia.

### **9.3 Respuesta a estrés biliar**

El paso a través del intestino del hospedero expone a *S. enterica* a sales biliares, potentes detergentes que alteran la membrana plasmática de las bacterias (Morales-Ramos *et al.*, 2003). Se ha reportado que el daño inducido por la bilis puede ser reproducido en condiciones de laboratorio con una sal biliar, el

desoxicolato de sodio (Prieto *et al.*, 2004; Prieto *et al.*, 2006). Bajo este enfoque reduccionista, en el presente trabajo se evaluó la concentración mínima inhibitoria a desoxicolato de sodio y la capacidad de formar biofilm, así como el daño celular inducido por esta sal biliar. Se determinó que la MIC del DOC de las cepas de estudio fue de 7% (p/v) para la cepa de referencia ATCC14028 (ST19), 10% para la cepa ST19 (SAL004) y 6% para la cepa ST213 (SAL115). La MIC de la cepa ATCC14028 fue igual a la reportada previamente para esta misma cepa y para *S. enterica* SL1344 (Prieto *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2012), y este valor fue considerado para realizar los ensayos de invasión y muerte celular post-estrés. Se observó una respuesta diferencial al daño inducido por DOC al 6%. Así, la cepa ST19 (SAL004) presentó mayor porcentaje de muerte celular debido a la exposición a DOC, seguida de la cepa de referencia ATCC14028 y, de manera interesante, se observó que la exposición a DOC parece favorecer el crecimiento de la cepa ST213 (SAL115) a una concentración de 6% en las condiciones probadas.

Se sabe que *S. enterica* induce la reparación al daño ocasionado por sales biliares mediante varias estrategias como la expulsión de la bilis por bombas de eflujo, modificaciones en la longitud del LPS y activación del sistema SOS (Hernández *et al.*, 2015). Cabe destacar que las gráficas obtenidas por citometría de flujo sugieren que la cepa ST213 (SAL115) presenta variabilidad fenotípica inducida por DOC, ya que se observa una mayor dispersión de puntos en las gráficas, lo que posiblemente se debe a la formación de células filamentosas. En contraste, tanto la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) como la cepa ambiental ST19 (SAL004) no presentaron este comportamiento. La cepa ST19 (SAL004) presentó el porcentaje de filamentación más bajo en condiciones post-estrés ácido (pH 1.5).

Se ha reportado que este genotipo ST19 no forma filamentos en condiciones asociadas a la conservación de alimentos, mientras que la cepa genotipo ST213 sí (Gómez-Baltazar *et al.*, 2019), lo que apoya la observación acerca de la dispersión diferencial de puntos que se observa en ambas cepas. En este mismo estudio se concluye que la cepa genotipo ST213 presenta más alternativas o estrategias para resistir el estrés en condiciones asociadas a la conservación de alimentos en comparación con el genotipo ST19. La variabilidad fenotípica que sugieren los

resultados aquí obtenidos posiblemente representan una estrategia para resistir el estrés, en la cual se podrían estar generando subpoblaciones derivadas de una misma clona celular, dando lugar al fenómeno recientemente descrito como biestabilidad.

La biestabilidad se ha reportado como un fenómeno que permite enfrentar el estrés, en el cual una población presenta un comportamiento generando dos linajes o subpoblaciones dentro de una misma población. Una población puede presentar un fenotipo “encendido”, mientras que la otra muestra un fenotipo “apagado” de determinados genes, siendo reversibles, regresando al fenotipo de la clona inicial. Los beneficios de la biestabilidad o división en subpoblaciones incluyen la división del trabajo y el enfrentamiento exitoso del estrés, evitando mutaciones en el genoma, como una estrategia evolutiva que le permite a *S. enterica* preservar la virulencia (Sánchez-Romero *et al.*, 2018). La cepa ST213 (SAL115) podría estar generando este fenómeno formando una población tendiente a la filamentación y otra a presentar el morfotipo de tamaño normal; sin embargo, aún habría que analizar en mayor detalle dicha posibilidad. Esto podría realizarse inhibiendo la condición de estrés y determinando posteriormente, la morfología de los bacilos se revierte al tamaño normal. Este ensayo estaría acompañado del análisis de la secuencia de los genes implicados en la filamentación, para determinar que no sufrieron cambios durante el paso por las condiciones de estrés.

#### **9.4 Ensayos de invasión y genes de virulencia**

*Salmonella enterica* cuenta con la capacidad de invadir células del intestino delgado, mediante un sistema de Secreción tipo III. En este estudio se evaluó la capacidad invasiva de las cepas analizadas en células HeLa que, aunque provienen de un linaje de células que deriva de una muestra de cáncer cervicouterino, este modelo se ha utilizado para identificar cepas con potencial invasivo y se ha reportado una correlación positiva entre el potencial invasivo *in vitro* en células HeLa con el potencial invasivo *in vivo* en conejos. Esta relación quedó demostrada desde 1973, cuando se evaluó la capacidad invasiva de 12 cepas de *S. Typhimurium* en modelos *in vivo* e *in vitro*. Dicho estudio encontró que las 8 cepas que internalizaron células HeLa también invadieron la mucosa ileal de conejo, mientras que las 4 que no

mostraron potencial invasivo *in vitro*, tampoco penetraron la mucosa ileal del conejo (Giannella *et al.*, 1973).

En el presente trabajo se encontró que la cepa de referencia ATCC14028 (ST19) y la ambiental de genotipo ST213 presentaron potencial invasivo sobre las células HeLa, mientras que la cepa ambiental de genotipo ST19 no fue invasiva. La salmonelosis ocasiona típicamente una infección diarreica autolimitada; sin embargo, en años recientes se ha reportado que en algunos casos puede ocasionar infecciones sistémicas. En nuestro país se han registrado casos de invasión sistémica por *S. enterica* genotipo ST213. En 2015 se publicó el aislamiento de *S. enterica* ST213 en Yucatán, de un hemocultivo en un niño de ocho años con hepatomegalia y trombocitopenia. Esta cepa presentó resistencia a múltiples fármacos y se identificó la presencia del gen *bla<sub>CMY-2</sub>* (Calva *et al.*, 2015). En otro trabajo posterior se identificó la presencia de *S. enterica* ST213 en un hemocultivo de una mujer que acudió a un hospital privado en la Cd. de México, la cual presentó un cuadro de salmonelosis grave invasiva, refractaria a cefalosporinas de espectro extendido. Dicha cepa presentó los plásmidos IncA/C, IncFIIA and ColE1 y la ausencia del plásmido de virulencia pSTV. Por otro lado, en ese mismo estudio evaluaron la capacidad invasiva de las cepas mencionadas usando un modelo murino, observándose una virulencia atenuada en ambas cepas (Wiesner *et al.*, 2016).

Al evaluar la internalización de células Caco-2 por parte de distintas cepas aisladas de alimentos en el estado de Michoacán, incluidas las dos cepas empleadas en este trabajo, la cepa ST19 (SAL004) no presentó capacidad de invasión, en comparación con las cepas de genotipo ST213. En dicho trabajo también se evaluó un modelo de invasión *in vivo*, encontrándose que la cepa ST213 (SAL115), la misma empleada en el presente trabajo, resultó ser la más invasiva, presentando mayor proliferación en tejidos y excretándose en mayor cantidad en heces (Gómez-Baltazar *et al.*, datos no publicados). Los resultados de invasión aquí obtenidos correlacionan con estos resultados previos.

En contraste con los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, en el presente trabajo se encontró que la cepa ST213 (SAL115) no presentó los genes *spvA*, *rck* y *pefC* del plásmido de virulencia pSVT, mientras que en las cepas ST19



(SAL004 y ATCC14028) sí estuvieron presentes. En aislados de *S. enterica* obtenidos de muestras clínicas y de alimentos de distintas regiones de México, se encontró una asociación significativa entre el genotipo ST19 y la presencia del plásmido pSVT (Wiesner *et al.*, 2009). Se documentó que la mayoría de las cepas (68%) genotipo ST19 presentaron tres genes (*spvC*, *traT* y *rck*) del pSVT, mientras que estos se encontraron sólo en una de las cepas genotipo ST213. Además, hubo una asociación significativa entre aquellos aislados de origen clínico y la presencia del plásmido pSVT, al encontrarse en un 43% de éstos y sólo en un 16% de muestras de alimentos. Muchas de estas cepas fueron de origen diarreico o de personas con infección asintomática, pero el plásmido pSVT sólo se presentó en una de las seis cepas de origen sistémico, lo que indica que su presencia no necesariamente causa infecciones extraintestinales o favorece la invasión del hospedero. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con estos reportes previos, que muestran que existe una relación positiva entre las cepas analizadas genotipo ST19 y la presencia del pSVT, pero no una asociación entre la presencia de este plásmido y la capacidad invasiva de los distintos genotipos. Lo anterior sugiere que los genes implicados en la capacidad invasiva de las cepas analizadas están codificados cromosómicamente.

## **9.5 Formación de biofilm**

Un biofilm puede estar formado por microorganismos de una misma especie o de especies distintas, con características asociadas a la comunidad microbiana y el microambiente en el que se desarrolla. Un biofilm puede establecerse prácticamente en cualquier tipo de superficie, y puede ser benéfico o perjudicial para un paciente, en función de la interacción de la comunidad y la superficie en la cual se establezca. La estructuración de un biofilm juega un papel muy importante en las enfermedades infecciosas, debido a que favorece la persistencia de un patógeno. Por esto, la caracterización de un biofilm particular, así como el desarrollo de nuevas estrategias para erradicarlo, es trascendental en el contexto de la salud del paciente (Magana *et al.*, 2018). En este estudio se evaluó la capacidad de las cepas de estudio para formar biofilm en presencia de distintas concentraciones con desoxicolato de sodio, una de las sales mayoritarias en la composición de la bilis.

Se encontró que todas las cepas formaron biofilm a una concentración de 1% de DOC, mientras que, en ausencia de éste, la cepa ST213 (SAL115) fue la que mostró una mayor capacidad en la formación de biofilm, seguida de la cepa de referencia. Sin embargo, en esta condición control en ausencia de DCO la cepa de genotipo ST19 (SAL004) no formó biofilm. Gómez- Baltazar *et al.* (2019) reportaron que la cepa ST19 (SAL004) no formó biofilm en ninguna condición asociada a la preservación de alimentos, ni en ausencia de estrés. De manera interesante, en presencia de DOC esta cepa sí formó biofilm, sugiriendo que este componente de las sales biliares induce la activación y probablemente aumenta el nivel de expresión de genes que favorecen la formación de biofilm en el genotipo ST19.

Se ha reportado que mutantes incompletas de los genes  $\Delta ompA$ ,  $\Delta flgE$  y  $\Delta phoP$  son incapaces de formar biofilm a una concentración de 16 mg/mL de bilis en un lapso de 24 h en caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institut), y la expresión de los mismos es más alta en presencia de bilis en cepas silvestres y mutantes de *S. Typhimurium* SL1344 (Tsai *et al.*, 2019). De manera interesante, en el presente trabajo también se observó la formación de biofilm en concentraciones de DOC de 12 y 13% en la cepa de referencia, y de 13% para la cepa ST19 (SAL004). Sin embargo, la cepa ST213 (SAL115) sólo formó biofilm a 1% de DOC. Se sabe que *S. enterica* puede resistir concentraciones más altas de desoxicolato cuando previamente ha estado en una concentración subletal de esta sal (Hernández *et al.*, 2012). Las muestras de las cuales se aislaron las cepas aquí analizadas fueron de alimentos, y se desconoce cuál fue la vía que siguieron dichas cepas para llegar a estas fuentes de aislamiento. Es probable que los ambientes previos a su aislamiento por lo que transitaban las cepas de estudio influyan en su capacidad para formar biofilm en las distintas concentraciones probadas. Los tipos de superficies, las condiciones fisicoquímicas y la competencia con otros microorganismos a las que una cepa ambiental se ha enfrentado pueden determinar su capacidad para formar biofilm, lo que es importante de contrastar a futuro entre cepas de genotipos ST19 y ST213.



## 10. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Por los resultados obtenidos se puede concluir que la hipótesis planteada se cumple parcialmente.

Aunque la cepa ST19 presenta mayor resistencia que la ST213 al ambiente oxidante ( $H_2O_2$ ) y al desoxicolato de sodio (DOC), la cepa ST213 presentó mejor recuperación a las condiciones de estrés ácido y oxidativo (pH ácido/ $H_2O_2$ ) después de 6 h, que las dos cepas del genotipo ST19. Además, en ausencia de estrés y post-estrés a DOC, el genotipo ST213 presentó mayor virulencia que la cepa de genotipo ST19. Estos resultados sugieren que el genotipo emergente ST213 se encuentra experimentando un proceso adaptativo de resistencia al estrés dentro del hospedero e incremento de virulencia, por lo que sólo en algunas condiciones de estrés fue más exitoso que el genotipo ST19.

Así, no se encontró una relación entre la virulencia y la resistencia a todas las condiciones de estrés del tracto digestivo del hospedero evaluadas. Es necesario realizar más estudios para identificar los mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos que contribuyen al desplazamiento del genotipo ST19 por el ST213 en muestras clínicas y ambientales de México y Michoacán. Por ejemplo, sería interesante evaluar los niveles de transcripción de genes asociados a la resistencia a estrés y virulencia antes, durante y después de estar sometidos a las condiciones de estrés aquí estudiadas. El mismo análisis transcripcional debería realizarse durante el proceso de invasión *in vitro* similar al aquí realizado.

También sería interesante analizar *in vitro* la posibilidad de que el genotipo ST213 presente una mayor capacidad de biestabilidad que el genotipo ST19 en las distintas condiciones de estrés a las cuales se expone dentro del hospedero.

Todo lo anterior podría contribuir a la prevención y el control adecuado de los brotes de gastroenteritis ocasionados por *S. enterica* en México, así como a un mejor entendimiento de los mecanismos asociados a la aparición de nuevas variantes genéticas de dicho patógeno.

## 11. REFERENCIAS

- Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, Krauland MG, Hale JL, Harbottle H, Uesbeck A, Dougan G, Harrison LH, Brisse S. 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *Plos Pathogens*. 8 (6):1-19. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776.
- Álvarez-Ordoñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, Hill C. 2011. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*. 157: 3268-3281.
- Andino A, Hanning Y. 2015. *Salmonella enterica*: survival, colonization and virulence differences among serovars. *Scientific World Journal*. 2015 (ID:520179): 1-16. doi: 10.1155/2015/520179
- Antunes P, Mourao J, Campo J, Peixe L. 2016. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infections*. 22(2): 110 – 121.
- Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. 2015. Global burden of invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, 2010. *Emerging Infectious Diseases*. 21(6): 941.
- Appia-Ayme C, Patrick E, Sullivan MJ, Alston MJ, Field SJ, AbuOun M, Anjum MF, Rowley G. 2011. Novel inducers of the envelope stress response BaeSR in *Salmonella* Typhimurium: BaeR is critically required for tungstate waste disposal. *Plos One Journal*. 6(8): e23713 doi: 10.1371/journal.pone.0023713
- Ashton P, Owen S, Kaindama L, Rowe W, Lane C, Larkin L, Nair S, Jenkins C, Pinna E, Feasey N, Hinton J, Dallman T. 2017. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Medicine*. 9(92). doi: 10.1186/s13073-017-0480-7
- Baker S, Dougan G. 2007. The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Clinical Infectious Diseases*. 45(1): 29-33.
- Balasubramanian R, Im J, Lee JS, Jeon HJ, Mogeni OD, Kim JH, Rakotozandrindrainy R, Baker S, Marks F. 2018. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 15(6): 1421-1426. doi: 10.1080/21645515.2018.1504717.

- Bäumler A, Fang FC. 2013. Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 12 (3): 1-19.
- Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Claude J, Gougerot-Pocidaló M, My-Chan Dang P. 2016. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in the host defense and inflammation. *Immunological Reviews*. 273(1): 180-193.
- Berk P, Jonge R, Zwietering M, Abee T, Kieboom J. 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology*. 99(4):859-866.
- Bos J, Zhang Q, Vyawahare S, Rogers E, Rosenberg S, Austin R. 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(1): 178-183.
- Branchu P, Bawn M, Kingsley R. 2018. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect and Immunity*. 86(8): e00079-18. doi: 10.1128/IAI .00079-18.
- Brenner FW, Villas RG, Angulo FJ, Tauxe R y Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(7): 2465-2467.
- Burton E, Yakandawala N, LoVetri, K, Madhyastha MS. 2007. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(1):1-4.
- Burton N, Schürmann N, Casse O, Steeb A, Claudi B, Zankl J, Schmidt A, Bumann D. 2014. Disparate impact of oxidative host defenses determines the fate of *Salmonella* during systemic infection in mice *Cell Host & Microbe* 15: 72-83.
- Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmhatt MN, Makwana PP. 2015. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Veterinary World*. 8(1): 121-124.
- Clements M, Ericksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JCD, Rhen M. 2001. Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. *Annual of Medicine*. 33(3): 178-185.
- Cossart P, Sansonetti PJ. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*. 5668(304): 242-248.
- De Toro M, Seral C, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo J, Sáenz Y. 2014. Antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* isolates. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 32(1): 4-10.

- Diaz-Ochoa V, Lam D, Lee C, Klaus S, Behnsen J, Liu J, Chim N, Nuccio S, Rathi S, Mastroianni J, Edwards R, Jacobo C, Cerasi M, Battistoni A, Ouellette A, Goulding C, Chazin W, Skaar E, Raffatellu M. 2016. *Salmonella* mitigates oxidative stress and thrives in the inflamed gut by evading calprotectin-mediated manganese sequestration. *Cell Host Microbe*. 19(6): 814-825.
- Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. 2011. Roles of the spiA gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology*. 157(6): 1798-1805.
- Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 8(3): 284-293.
- Evans M, Fink R, Vázquez-Torres A, Porwollik S, Jones-Carson J, McClelland M, Hassan H. 2011. Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. *BMC Microbiology* 11(58): 2-16.
- Hiley L, Graham R, Jennison A. 2019. Genetic characterisation of variants of virulence plasmid, pSLT, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provides evidence of variety of evolutionary directions consistent with vertical rather than horizontal transmission. *Plos One*: 14(4): e0215207. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215207>.
- Finn S, Rogers L, Händler K, McClure P, Amézquita A, Hinton JC, Fanning S. 2015. Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to three humectants used in the food industry induces different osmo-adaptation systems. *Applied Environmental Microbiology*. 81(19): 6800-6811.
- Figuroa-Ochoa IM, Verdugo-Rodríguez A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(1-2): 25-42.
- Gal-Mor O. 2019. Persistent infection and long-term carriage of typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Clinical Microbiology Reviews*. 32(1): e00088-18.
- Gal-Mor O, Boyle, Grassl G. 2014. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*. 5(4): 391. doi: 10.3389/fmicb.2014.00391.

- Giannella R, Washington O, Gemski P, Formal S. 1973. Invasion of HeLa cells by *Salmonella* Typhimurium: A model for study of invasiveness of *Salmonella*. *The Journal of Infectious Diseases*. 128 (1): 69-75.
- Giaouris E, Heredero I, Desvaux M, Hébraud M, Moretro T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas G, Kacaniová M, Czacyk K, Olmez H, Simoes M. Intra-and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. 2015. *Frontiers in Microbiology*. 841(6):1-26. doi: 10.3389/fmicb.2015.00841.
- Gómez-Baltazar A, Vázquez-Garcidueñas M, Larsen J, Kuk-Soberanis M, Vázquez-Marrufo G. 2019. Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Food Microbiology*. 82: 302-315. doi: 10.1016/j.fm.2019.03.010.
- Gómez-Baltazar A, Vázquez-Garcidueñas M, Ochoa-Zarzosa A, Vázquez-Marrufo G. 2017. Análisis de la virulencia de dos genotipos de *Salmonella enterica* aislados de alimentos en Michoacán. Tesis Doctoral de la UMSNH.
- González J, Alberts H, Lee J, Doolittle L, Gunn J. 2018. Biofilm formation protects *Salmonella* from the antibiotic ciprofloxacin *in vitro* and *in vivo* in the mouse model of chronic carriage. *Scientific Reports*. 8(1): 222. doi: 10.1038/s41598-017-18516-2.
- González L, Franco M. 2015. Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico. *Food Technology Brazilian Journal*. 18(3): 250–257.
- Gunn J. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*. 2 (8): 907-913.
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade MC. 2000. Serotipos de *Salmonella* identificada en los servicios de salud de México. *Salud Pública México*. 42: 490-495.
- Haraga A, Ohlson M, Miller S. 2008. *Salmonella* interplay with host cells. *Nature Reviews*. 6: 53-66.
- Hébrard M, Viala J, Méresse S, Barras F, Aussel L. 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to *Salmonella* virulence and oxidative stress resistance. *Journal of Bacteriology*. 191(14): 4606-4614.
- Hensel M. 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal Medical Microbiology*. 294(2-3): 95-102.



- Hernández S, Cava F, Pucciarelli G, García-del Portillo F, De Pedro M, Casadesús J. 2015. Bile induced peptidoglycan remodelling in *Salmonella enterica*. *Environmental microbiology*. 17(4): 1081-1089.
- Hernández S, Cota I, Ducret A, Aussel L, Casadesús J. 2012. Adaptation and preadaptation of *Salmonella enterica* to bile. *Plos Genetics*. 8(1): e1002459. doi: 10.1371/journal. Pgen.1002459.
- Hiley L, Graham R, Jennison A. 2019. Genetic characterization of variants of the virulence plasmid, pSLT, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium provides evidence of a variety of evolutionary direction consistent with vertical rather than horizontal transmission. *Plos One*. 14(4): e0215207.
- Humphrey S, Clark LF, Humphrey TJ, Jepson M. 2011. Enhanced recovery of *Salmonella* Typhimurium DT104 from exposure to stress at low temperature. *Microbiology*. 157(4): 1103–1114.
- Humphrey S, MacVicar T, Stevenson a, Roberts M, Humphrey TJ, Jepson MA. 2011. *SulA*-induced filamentation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: effects on SPI-1 expression and epithelial infection. *Journal Applied Microbiology*. 111(1): 185-196.
- Jennings E, Thurston T and Holden D. 2017. *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host & Microbe*. 19(2): 217-231.
- Jones T, Vail K, McMullen L. 2013. Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. *International Journal of Food Microbiology*. 165(2): 97-110.
- Jurado-Jiménez R, Arenas-Muñoz C, Doblas-Delgado A, Rivero A, Torre-Cisneros J. 2010. Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine*. 2010. 10(52): 3497-3501.
- Kaiser P, Hardt WD. 2011. *Salmonella typhimurium* diarrhea: switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense. *Current Opinion in Immunology*. 23(4): 456-463.
- Kuk-Soberanis M, 2016. Caracterización metabólica y respuesta a estrés de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de alimentos colectados en Michoacán. *Tesis de Maestría de la UMSNH*. 30-32.

- Kumar G, Macarasin D, Micallef S. 2018. *Salmonella enterica* filamentation induced by pelargonic acid is a transient morphotype. *Applied and Environmental Microbiology*. 85 (2): e02191-18.
- Kenyon WJ, Spector MP. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*. 45: 455–481.
- Lago M, Monteil V, Douche T, Guglielmini J, Criscuolo A, Maufrais C, Matondo M, Norel F. 2017. Proteome remodeling by the stress sigma factor RpoS/ in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional. *Scientific Reports*. 2127(7): 1-15. doi: 10.1038/s41598-017-02362-3.
- Land M, Houser L, Jun S, Nookaew I, Leuze M, Ahn T, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery D. 2015. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*. 15(2): 141 – 161.
- Larsen M, Cosentino S, Rasmussen S, Friis c, Hasman H, Marving L, Jelsbak L, Sichert-Pomten T, Ussery D, Aarestrup F, Lund O. 2012. *Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced bacteria*. *Journal of Microbiology*. 50 (4): 1355 – 1361.
- López-Montero N, Ramos-Marqués E, Risco C, García-del Portillo F. 2016. Intracellular *Salmonella* induces aggregophagy of host endomembranes in persistent infections. *Autophagy*. 12(10): 1886-1901.
- Leekitcharoenphon P, Friis C, Zankari E, Svendsen CA, Price LB, Rahmani N, Herrero-Fresno A, Fashae K, Vandenberg O, Aarestrup FM, Hendriksen RS. 2013. Genomics of an emerging clone of *Salmonella* serovar Typhimurium ST313 from Nigeria and the Democratic Republic of Congo. *Journal of Infection in Developing Countries*. 7(10): 796-706.
- Li W, Li Y, Liu Y, Shi X, Jiang M, Lin Y, Qiu Y, Zhang Q, Chen Q, Zhou L, Sun Q, Hu Q. 2017. Clonal expansion of biofilm forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with multidrug-resistance phenotype in the southern coastal region of China. *Frontiers in Microbiology*. 8:2090. doi: 10.3389/fmicb.2017.02090.
- Lianou A, Koutsoumanis KP. 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 160(2): 171–178.

- Lianou A, Nychas G, Koutsoumanis KP. 2017. Variability in the adaptative acid tolerance response phenotype of *Salmonella enterica* strains. *Food Microbiology*. 62: 99-105.
- Lobato D, Molina L, Moreno I, García F, Díaz R. 2016. Stabilization of the virulence plasmid pSLT of *Salmonella* Typhimurium by three maintenance systems and its evaluation by using a new stability test. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 3(66). doi: 10.3389/fmolb.2016.00066.
- Magana M, sereti C, Ioannidis A, Mitchell c, Ball A, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin M, Hadjifrangiskou M, Tegos G. 2018. Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*. 31(3): e00084-16.
- Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien S J, Hoekstra RM. 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50(6): 882–889.
- Margas E, Meneses N, Conde-Petit B, Dodd CER. 2014. Survival and death kinetics of *Salmonella* strains at low relative humidity, attached to stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 187: 33–40.
- Mattick KL, Jorgensen F, Legan J, Cole M, Porter J, Lappin-Scott H, Humphrey TJ. 2000. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4): 1274-1279.
- Miao E, Alpuche-Aranda C, Dors M, Clark A, Bader M, Miller S, Aderem A . 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nature Immunology*. 7(6): 569–575.
- Misselwitz B, Kreibich SK, Rout S, Stecher B, Periaswamy B, Hardt WD. 2011. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infection and Immunity*. 79(1): 330-341.
- McMahon MAS, Xu J, Moore JE, Blair IS, and McDowell DA. 2007. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1): 211-217.
- Miranda JM, Mondragón AC, Martínez B, Guarddon M, and Rodríguez JA. 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. *Journal of Food Protection*. 72(5): 966–71.

- Morales-Ramos F, Prieto A, Beuzón C, Holden D, Casadesús J. 2003. Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *Journal of Bacteriology*. 185(17): 5328-5332.
- Parkhill J, Dougan G, James KD, Thomson NR, Pickard D, Wain J, Churcher C, Mungall K, Bentley S, Holden M, Sebaihia M, Baker S, Basham D, Brooks K, Chillingworth T, Connor P, Cronin A, Davis P, Davies R, Dowd L, White N, Farrar J, Feltwell T, Hamlin N, Haque A, Hien T, Holroyd S, Jagels K, Larsen T, Leather S, Moule S, Gaora P, Parry C, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell B. 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*. 413: 848–852.
- Parsons B, Humphrey S, Salisbury A, Mikoleit J, Hinton J, Gordon M, Wigley P. 2013. Invasive non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 are not host-restricted and have an invasive phenotype in experimentally infected chickens. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 7(10): e2487.
- Pham O, McSorley S. 2015. Protective host immune responses to *Salmonella* infection. *HHS Public Access*. Disponible en URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323267/#R25](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323267/#R25).
- Prieto A, Ramos-Morales F, Casadesús J. 2004. Bile-induced DNA damage in *Salmonella enterica*. *Genetics*. 168(4): 1787-1794.
- Prieto A, Ramos-Morales F, Casadesús J. 2006. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. *Genetics*. 168(4): 1787-1794.
- Popoff MY, Bockemuhl J, Brenner FW, and Gheeling LL. 2001. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*. 152: 907-909.
- Prescott L, Harley J, Klein D. 2004. En: Microbiología. 5ª edición. Ed. McGraw Hill, Madrid. Pp. 62.
- Regalado-Pineda ID. 2011. Aislamiento y Caracterización Bioquímica y Genética de *Salmonella enterica Subsp. enterica* en productos cárnicos y derivados lácteos de Michoacán, México. Datos no publicados.

- Rychlik I, Barrow PA. 2005. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 29: 1021-1040.
- Silva C, Calva E, Calva J, Wiesner M, Fernández-Mora M, Puente J, Vinuesa P. 2015. Complete genome sequence of human invasive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain of emerging sequence type 213 harboring a multidrug resistance IncA/C plasmid and a <sup>bla</sup>CMY-2 carrying IncF plasmid. *Genome Announcements*. 3(6): e01323-15.
- Silva C, Puente J, Calva E. 2017. *Salmonella* virulence plasmid: pathogenesis and ecology. *Pathogens and disease*. 75(6). doi: doi:10.1093/femspd/ftx070.
- Saldarriaga A, Rugelesm MT. 2000. Genes y plásmidos de la *Salmonella* spp. Asociados con virulencia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 14(1):11-19.
- Sánchez-Valdés JJ, Colín-Navarro V, López-González F, Avilés-Nova F, Octavio Castelán-Ortega A, and Estrada-Flores JG. 2016. *Salud Pública de Mexico* 58 (4):461–67.
- Sánchez-Romero M y Casadesús J. 2018. Contribution of SPI-1 bistability to *Salmonella enterica* cooperative virulence: insights from single cell analysis. *Scientific Reports*. 8(14875). doi:10.1038/s41598-018-33137-z.
- Spector MP and KenyonWJ. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research Internaional*. 45(29):455–481.
- Stackhouse R, Faith N, Kaspar C, Czuprynski C, Lee A. 2012. Survival and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis filaments induced by reduced water activity. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(7): 2213-2220.
- Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker S. 2012. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 45: 502-531.
- Tam MA, Rydstrom A, Sundquist M, Wick MJ. 2008. Early cellular responses to *Salmonella* infection: dendritic cells, monocytes and more. *Immunological Reviews*. 225: 140–162.

- Torkelson J, Harris R, Lombardo M, Nagendran J, Thulin C, Rosenberg S. 1997. Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *The EMBO Journal*. 16:3303-3311.
- Tsai M, Liang Y, Chen C, Chiu C. 2020. Characterization of *Salmonella* resistance to bile during biofilm formation. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 53(4): 518-524. doi: 10.1016/j.jmii.2019.06.003.
- Suzanne C, Robinson E, Löwe J. 2003. Crystal structure of the SOS cell inhibitor Sula and complex with FtsZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(13): 7889-7894.
- Trafny EA, Lewandowski R, Zawistowska-Marciniak I, Stępińska M. 2013. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 29(9): 1635-1643.
- Urdaneta V, Hernández S, Casadesús J. 2019. Mutational and non mutational adaptation of *Salmonella enterica* to the gall bladder. *Scientific Reports*. 9(5203). doi: 10.1038/s41598-019-41600-8.
- Uzzau S, Brown D, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesús J, Platt D, Olsen J. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*. 125: 229-55.
- Vázquez-Garcidueñas MS, Romero-Pérez NL, Figueroa-Aguilar GA, Jaime-Sánchez JL, and Vázquez-Marrufo G. 2014. Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. *Journal of Infection in Developing Countries*. 8(2): 143-153.
- Westerman T, Bogomolnaya L, Andrews-Polymenis H, Sheats M, Efenbein J. 2018. The *Salmonella* type-3 secretion system-1 and flagellar motility influence the neutrophil respiratory burst. *Plos One*. 13(9): e0203698. doi: 10.1371/journal.pone.0203698.
- WHO. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. Geneva, World Health Organization.
- Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernández-Mora M, Calva JJ and Silva C. 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with

- chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiology*. 9:131. doi: 10.1186/1471-2180-9-131.
- Wiesner M, Calva E, Fernández-Mora M, Cevallos M, Campos F, Zaidi M, and Silva C. 2011. *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiology*. 11(9). doi: 10.1186/1471-2180-11-9.
- Wiesner M, Calva J, Bustamante V, Pérez-Morales D, Fernández-Mora M, Calva E, Silva C. 2016. A multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the *bla*CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC Microbiology*. 16(18). doi: 10.1186/s12866-016-0633-7.
- Winfield MD and Groisman EA. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 3687–3694.
- Yang Y, Khoo WJ, Zheng Q, Chung HJ, Yuk HG. 2014. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. *International Journal of Food Microbiology*. 172: 102-109.
- Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-García MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, McDermott P, and Tollefson L. 2008. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico *Emerging Infectious Diseases*. 14: 429-4353.

## 12. ANEXO

### 12.1 Secuencia ATCC14028 (ST19)

ATATGCCGGTAACGCACTGCGTGGTTACGGTAATCTTATTATCATCAAACATAACGATGATTAC  
CTGAGTGCCTACGCCATAATGATACGATGCTGGTCCGGGAACAACAGGAAGTTAAGGCGGG  
GCAAAAAATCGCTACTATGGGTAGCACCGGCACCAGCTCTACACGCTTGCAATTTGAAATTCGT  
TACAAGGGGAAATCCGTAAACCCGCTGCGTTATTTACCGCAGCGATAAAGCGGCGGAACCAG  
GCTTTGACTTGCTAGTTCCGTCAAGGGATCACGGGTAGGAGCCACCTTatgAGTCAGAATACGC  
TGAAAGTTCATGATTTAAATGAAGACGCGGAATTTGATGAGAACGGAGTAGAGGCTTTTGACGA  
AAAAGCCTTGAGTGAAGAGGAACCCAGTGATAACGACCTGGCTGAAGAAGAGCTGTTATCGCA  
AGGGGCCACACAGCGTGTGTTGGACGCGACTCAGCTTTACCTTGGTGAGATTGGGTATTCACC  
ACTGTTAACAGCCGAAGAAGAAGTCTATTTTGC GCGTTCGCGCACTGCGTGGAGATGTCGCTTC  
TCGCCGTCGCATGATTGAGAGTAACCTGCGTCTGGTGGTAAAATTGCCCGCCGTTATGGCAA  
TCGTGGACTGGCGTTGCTGGACCTGATTGAAGAGGGCAACCTGGGGCTTATCCGTGCAGTCG  
AGAAGTTTGACCCGGAACGCGGGTTCCGCTTCTCAACATACGCAACCTGGTGGATTGCCAGA  
CAATCGAACGGGCGATCATGAACCAAACCCGTACGATTGCTTGCCGATTCACATTGTTAAAG  
AGCTGAACGTATACCTGCGCACCGCACGTGAGTTGTCGCATAAACTGGACCACGAACCGAGT  
GCGGAAGAAATTGCAGAGCAACTGGATAAACC GGTTGATGACGTCAGCCGTATGCTTCGTCTC  
AACGAGCGCATTACCTCGGTAGACACCCCGCTGGGCGGTGATTCCGAAAAAGCGTTGCTGGA  
CATCCTGGCCGATGAAAAAGAGAACGGTCCGGAAGACACCACGCAAGATGACGATATGAAAC  
AGAGCATCGTCAAATGGTTGTTTCAACTGAACGCCAAACAGCGTGAAGTGCTGGCGCGCCGT  
TTCGGTCTGCTGGGATATGAAGCTGCGACACTGGAAGATGTAGGCCGTGAAATCGGTCTTACG  
CGTGAACGTGTTTCGTCAGATTCAGGTTGAAGGCCTGCGCCGTCTGCGCGAAATTCTGCAGAC  
GCAGGGGCTGAATATCGAAGCGCTGTTCCGCGAGtaaGTACCCTTGTCAAAAAAGGCCAGTC  
TGTCGACTGGCCTTTTTTTTACCGTTTGTCTTCTGCCAGCAGCGGCGGGATACTCGGCACCAT  
TGGCGCGTCATCAATATCTTTTTGCGTCATGCGAAACGCTTGTGGATAGTGTTTCGCGGCTGGT  
ACGGCGTAACGGTTCGGTATCGCGCCAGGTATACAGACAATGCTGACACTGATATACCGTCCA  
GACTCCTTTTACCGGCGAAGTCGCCATGAGTTCAATATGTGCATCGGCACAGCGTGGGCAAAT  
CATCGGTTACTCCTTATTTACG