



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL

GERARDO VELASCO GIL

2182028497

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE
SALMONELLA ENTERICA RECUPERADAS DE REPTILES

Introducción

Salmonella es un género de bacterias relevantes porque representan un riesgo para la salud humana y animal. La patogenicidad de *Salmonella* está determinada por distintos tipos de genes de virulencia, entre los que se encuentran los flagelares, capsulares, sistemas de secreción y sistemas de adherencia. La adhesión es considerada como uno de los pasos más relevantes en la patogénesis de *Salmonella*, la cual se describe a grandes rasgos como la adhesión a la célula hospedera, la internalización en la misma y la consecuente infección. Las fimbrias son uno de los elementos más importantes en la adhesión de *Salmonella* y otras bacterias. La clasificación más empleada actualmente para estas estructuras se da en base a 3 mecanismos distintos de ensamblaje: chaperona-acomodador (CA), nucleación-precipitación (NP) y la fimbria tipo IV. Estos genes no suelen ser expresados bajo condiciones controladas de laboratorio, haciendo difícil el estudio de sus mecanismos *in vitro*, así como los inductores que activan estos genes. El estudio de estos sistemas y sus respectivos genes nos permite entender mejor la patogénesis de *Salmonella*. El entendimiento de este proceso nos permite idear nuevas técnicas terapéuticas o de identificación, categorizar cepas con fines diagnósticos o de investigación, y generar mejores estrategias epidemiológicas. La intención en este trabajo es analizar la presencia de 11 genes fimbriales en cepas de *Salmonella* recuperadas de especies reptiles. Además, se sientan las bases para futuras investigaciones sobre la

expresión de estos genes bajo condiciones similares al microambiente gastrointestinal humano, como una evaluación de relevancia en microorganismos zoonóticos.

Planteamiento del problema y justificación

El género *Salmonella* tiene un impacto considerable en la salud pública. La frecuencia de gastroenteritis asociada a *Salmonella* (también llamada salmonelosis) se estima en 93.8 millones de casos y una mortalidad de 155 mil al año a nivel mundial. Muchas cepas de *Salmonella* han mostrado complejos mecanismos de adaptabilidad y una diversidad importante, con unos 2600 serotipos identificados, siendo los dos más relevantes *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*. El estudio de los mecanismos patogénicos de las bacterias de este género sigue siendo de vital importancia para lograr el desarrollo de nuevas estrategias y terapias que logren reducir el impacto social que este microorganismo tiene. Las fimbrias y sus mecanismos de adhesión se han identificado como procesos de suma importancia en la patogénesis de *Salmonella* y otras bacterias, siendo este un primer paso para la infección.

Salmonella tiene además capacidad zoonótica, lo que implica un riesgo constante en la ingesta de alimentos o el contacto con animales infectados o reservorios de la bacteria. El análisis de los genes presentes en cepas provenientes de reptiles es de relevancia para entender el riesgo que representan para la salud humana y animal, así como nuevas estrategias terapéuticas para el control de la salmonelosis. La presente evaluación sentará las bases para el estudio de la expresión de estos genes bajo condiciones similares a la humana, para entender los mecanismos y el impacto que tiene la zoonosis de estos microorganismos de reptiles a humanos.

Objetivos

General:

Determinar la existencia de operones fimbriales en cepas de *Salmonella* spp provenientes de individuos silvestres para establecer su importancia en salud pública.

Específicos

1. Establecer la presencia de genes fimbriales en cepas de *Salmonella* recuperadas de reptiles.
2. Analizar las variaciones genómicas existentes entre las cepas recuperadas.

Antecedentes

Salmonella es un género bacteriano de relevancia para nuestra especie, pues es un patógeno capaz de infectar humanos y muchos otros animales. Se estima que la gastroenteritis asociada a *Salmonella*, el tipo más común de salmonelosis, afecta a 93.8 millones de pacientes resultando en 155000 muertes al año a nivel mundial. Las cepas de *Salmonella* han mostrado diversos mecanismos de tolerancia y una adaptabilidad importante, que ha resultado en unos 2600 serotipos conocidos

que afectan a un amplio número de especies, incluyendo al ser humano. Los más relevantes son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, serotipos responsables de aproximadamente un 80% de las salmonelosis no tifoideas (Rehman et al., 2019). La mayor parte de los serotipos, incluyendo los antes mencionados, suelen causar cuadros de gastroenteritis autolimitante. Los cuadros infecciosos con serotipos Typhi o Paratyphi suelen conducir a la fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica severa (Linke & Goldman, 2011). Muchos animales son susceptibles a la infección por *Salmonella* o al menos a formar reservorios de esta bacteria, actuando como vectores del microorganismo para el ser humano. Entre las especies afectadas se encuentran muchas empleadas en producción alimenticia como el cerdo, la res, aves de corral y peces. Otras especies en contacto cercano con el ser humano también son capaces de contraer la enfermedad, como perros, gatos, caballos y reptiles. Esta capacidad de adaptación y patogenicidad tan diversa conllevan una imperante relevancia en el estudio de los mecanismos zoonóticos de estos microorganismos, al representar un constante riesgo con múltiples vías de contagio a nivel productivo y social (Rehman et al., 2019).

La patogenicidad de *Salmonella* implica muchos factores de virulencia, entre los que se listan plásmidos, cápsula, flagelo, sistemas de secreción y sistemas de adherencia. La adhesión está mediada por estructuras especializadas denominadas fimbrias, los cuales son apéndices filamentosos distintos a los flagelares. Las fimbrias poseen una longitud de 0.5 a 10 μm y un ancho de 2 a 8 nm. Estos aparatos son estructuras proteicas especializadas que contienen distintas proteínas entre las que se encuentran las denominadas adhesinas, que median los procesos de adhesión. La adhesión fimbrial sirve entre otras cosas, para mediar la interacción con células inmunológicas como macrófagos, formación de biopelículas o agregación bacteriana. Las fimbrias de *Salmonella* se clasifican con base en su serotipo característico; en su morfología y patrones de aglutinación; o en su mecanismo de ensamblaje, clasificación más empleada en la actualidad. La clasificación por mecanismo de ensamblaje comprende 3 tipos importantes: vía de chaperona-acomodadora (CA), vía de la nucleación-precipitación extracelular (NP) y el sistema de secreción tipo II, un sistema especializado que caracteriza a las fimbrias tipo IV (T4). Los grupos de genes fimbriales (FGC, de *Fimbrial Gene Clusters*) en *Salmonella* consisten de 4 a 15 genes que codifican proteínas para su estructura, ensamblaje y regulación. Se han identificado un total de 38 FGCs únicos en *Salmonella* a partir de la secuenciación de 111 genomas de 34 serotipos distintos, y estos sirven actualmente como marcadores para la identificación y tipificación de este género (Rehman et al., 2019). De los distintos genes fimbriales empleados como marcador para *Salmonella* se desarrollarán 11 de acuerdo con los fines de este estudio:

pegA. Este gen codifica para una subunidad fimbrial de función estructural, proteína compuesta por 177 aa. La eliminación de este gen en algunas cepas de *S. Enteritidis* mostró una disminución en su velocidad de colonización en intestino de pollo (Clayton et al., 2008). Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *pegABCDE*, cuya adhesina corresponde a *pegD* con afinidad por una diana indeterminada (Rehman et al., 2019).

lpfA. Este gen codifica para la subunidad mayor de la fimbria larga polar, compuesta por 174 aa. Identificado y descrito por primera vez como parte de un operón fimbrial de *Salmonella enterica* Typhimurium que codifica para una adhesina putativa denominada fimbria larga polar (LPF, de *Long Polar Fimbriae*) (Bäumler & Heffron, 1995). Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *lpfABCDE*, cuya adhesina corresponde a *lpfD* y tiene afinidad por células M en las placas de Peyer en modelos murinos (Rehman et al., 2019). Las proteínas de ensamblaje son codificadas por *lpfB*

(chaperona) y *lpfC* (acomodadora). La subunidad menor fimbrial corresponde a *lpfE* y *lpfD* codifica para otra subunidad estructural (Quan et al., 2019). También se ha descrito la importancia de esta fimbria, en conjunto con Pef y Tafi para la formación de biopelícula en cultivos de HEP-2 (cáncer epidérmico humano) y epitelio intestinal de gallina (Ledebouer et al., 2006). Se ha encontrado LpfD se une a proteínas extracelulares como fibronectina, a la cual se une fuertemente *in vitro*, y menormente a laminina y colágenos IV y V (Zhou et al., 2019).

steA. Subunidad fimbrial, proteína efectora de sistema de secreción tipo III, compuesta por 210 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *steABCDEFGHIIJ*, cuya adhesina corresponde a *steG* con afinidad por una diana indeterminada (Rehman et al., 2019). La delección de este gen en cepas de *S. Enteritidis* mostró la disminución de la capacidad de persistencia de la enfermedad después de 7 días de infección en modelos de pollo (Clayton et al., 2008).

sefA. Proteína estructural fimbrial compuesta por 176 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *sefABCD* (Rehman et al., 2019). La fimbria codificada por este grupo se denomina como SEF14, adquiriendo su nombre al ser descrita como una fimbria de *S. Enteritidis* (*Salmonella Enteritidis Fimbriae*). La subunidad de *sefA* es ensamblada en la superficie celular con ayuda de la chaperona *sefB*, mientras que *sefC* codifica una proteína acomodadora que se encarga de dirigir y ordenar las subunidades para su ensamblaje (Quan et al., 2019). El gen *sefD* codifica para una adhesina con una diana desconocida, pero se ha demostrado que tiene la capacidad de unirse a receptores en la superficie de macrófagos (modelo murino), mediando un mecanismo de supervivencia contra la respuesta inmunitaria del hospedero, pues las cepas mutantes carentes de *sefD* perdían la capacidad de adherirse y sufrían una respuesta hostil por parte del macrófago resultando en la muerte celular (Edwards et al., 2000). La regulación de la transcripción del FGC está dada por una proteína tipo AraC codificada por *sefR*, un gen adyacente a *sefD* (Quan et al., 2019).

sthA. Proteína chaperona de biogénesis fimbrial, compuesta por 227 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *sthABCDE*, cuya adhesina corresponde a *sthE* con afinidad por una diana indeterminada (Rehman et al., 2019). Se ha sugerido que *sth* tiene un rol en la habilidad de *S. Typhimurium* para integrarse a las heces y salir del organismo, probablemente como un mecanismo para colonizar nuevos hospederos. También se ha relacionado con la capacidad tardía (30 días de infección) de infectar el ciego (Weening et al., 2005).

stfA. Subunidad fimbrial putativa, compuesta por 186aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *stfABCDEFGH*, cuya adhesina corresponde a *stfH* con afinidad por una diana indeterminada (Rehman et al., 2019). De Masi y colaboradores describen 4 alelos distintos de *stfH* denominados A1, A2, B1 y B2. B2 mostró una adherencia significativa y preferencial por células humanas (RKO), mientras que A1 mostró este comportamiento tanto en células humanas como bovinas (CMS); A2 y B1 mostraron una adherencia débil en células bovinas; finalmente, todos los alelos mostraron una adherencia débil pero no despreciable a células porcinas (IPEC-J2). También se demostró selectividad por parte de los alelos A1 y A2 por células de origen yeyunal y colónico, mostrando un nivel más alto de selectividad dependiente del tejido y sus respectivos receptores (De Masi et al., 2017).

stdA. Proteína fimbrial putativa compuesta por 194 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *stdABCD*, cuya adhesina corresponde a *stdD* y posee afinidad por residuos de α -(1,2)-Fucosa (Rehman et al., 2019). Se ha encontrado un importante rol de la fimbria Std en la persistencia de la

enfermedad. **Zuwandi** y colaboradores encontraron una evolución similar dentro de los primeros días del inóculo en un grupo con el gen *fut2* (cuyo producto, galactosido 2- α -L-fucosiltransferasa 2, cataliza la glicosilación de proteínas de membrana con los residuos de fucosa reconocibles por StdD) y otro grupo con la delección del mismo. Al tiempo de 7 días, comenzaron a notarse cambios importantes en la evolución de la enfermedad en cuanto a la persistencia de la infección e inflamación, fenómeno más notable con el paso de los días. Además, utilizaron cepas con delección del FGC *std*, encontrando un comportamiento similar en ambos grupos de estudio y una carencia de la persistencia de la enfermedad en ambos casos. La presencia de bacterias estaba principalmente localizada en el ciego y colon en los casos persistentes del grupo *fut2* positivos, zonas epiteliales donde se presume que se presenta principalmente la glicosilación con α (1,2)-Fucosa en proteínas de la superficie celular (**Zuwandi et al., 2019**).

bcfA. Subunidad fimbrial compuesta por 180 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *bcfABCDEFGH*, cuya adhesina corresponde a *bcfD* con afinidad por una diana indeterminada (**Rehman et al., 2019**). Recibe su nombre de su relación con la infección de hospederos bovinos (**Cheng et al., 2021**). Mutantes con delección de este gen han mostrado una tendencia a la formación de biopelícula en células epiteliales humanas e intestino de gallina, pudiendo sugerir que Bcf interfiere con la expresión o función de otras fimbrias. También se ha encontrado una relación en el mejoramiento de la adhesión de *Salmonella* a células intestinales humanas y porcinas usando nuevamente cepas mutantes. Un dato curioso es que Bcf mostró adherencia a células humanas RKO (carcinoma rectal), pero no a células Caco-2 (carcinoma de colon), sugiriendo una especificidad por receptores que sólo se encuentran en ciertas regiones del tracto gastrointestinal. Otro dato relevante es que *bcfD* tiene dos alelos conocidos, siendo uno de ellos más afín a células humanas (RKO) y el otro a células porcinas (IPEC-J2), mientras que ambos mostraron una afinidad baja pero considerable a células bovinas (**De Masi et al., 2017**).

fimA. Subunidad mayor de la fimbria tipo I, también denominada SEF21, compuesta por 185 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *fimAICDHFZYW*, es un grupo constitutivo ausente solo en las cepas de *Salmonella bongori*, cuya adhesina corresponde al gen *fimH* y muestra afinidad por eritrocitos, residuos de manosa y glicoproteína-2 (**Rehman et al., 2019**). El ensamblaje se lleva a cabo por la chaperona codificada por *fimC*, una porina de membrana externa codificada por *fimD*, un mediador codificado por *fimI* y un adaptador por *fimF*. Dos recombinasas de diana específica responsables de la regulación de la transcripción del FGC, *fimB*, cuyo producto tiene la capacidad de regular positiva o negativamente; y *fimE*, cuyo producto regula solo negativamente. *fimZ*, *fimY* (fosfodiesterasa) y *fimW*, se describen como proteínas reguladoras (**Quan et al., 2019**).

stiA. Subunidad fimbrial putativa compuesta por 179 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *stiABCH*, cuya adhesina corresponde a *stiH* con afinidad por una diana indeterminada (**Rehman et al., 2019**). Se ha demostrado que existe una expresión activa de los genes *sti*, *saf*, *stc* y *agf* en vaso de ratón. La delección cuádruple de estos genes genera una considerable disminución en la capacidad patogénica de *S. Typhimurium* en vaso e hígado de ratón (**Laniewski et al., 2017**). La delección de este gen en cepas de *S. Enteritidis* mostró la disminución de la capacidad de persistencia de la enfermedad después de 7 días de infección en modelos de pollo (**Clayton et al., 2008**).

stbA. Gen de *locus* plasmídico. Proteína de partición de plásmido y estabilidad, compuesta por 344 aa. Pertenece al grupo de síntesis por CA, el FGC es *stbABCDEF*, cuya adhesina corresponde a *stbD*

con afinidad por una diana indeterminada (Rehman et al., 2019). Se ha sugerido que *stb* tiene un rol en la habilidad de *S. Typhimurium* para integrarse a las heces y salir del organismo, probablemente como un mecanismo para colonizar nuevos hospederos. También se ha relacionado con la capacidad tardía (30 días de infección) de infectar el ciego (Weening et al., 2005).

La genotipificación y fenotipificación tiene mucha relevancia para el entendimiento y control de organismos patógenos y las enfermedades que producen. Este exitoso control está relacionado con un sistema eficiente de observación epidemiológica nacional y por tanto una eficiente prestación de servicios de salud. En el caso de *Salmonella* existe mucha variabilidad en cuanto a su virulencia entre cada serotipo, pero incluso entre ejemplares de un solo serotipo, la variabilidad en la presencia de genes de virulencia es alta. Aparentemente existen genes que están relacionados a procesos esenciales de supervivencia, como es el caso de *lpfA* y *csgA*, dos genes fimbriales presentes en el 100% de los individuos en un estudio de 126 aislados de *Salmonella* Heidelberg. Por otra parte, existen genes como *sefA*, que no se encontraron en ninguno de los aislados, indicando que no son genes esenciales y que probablemente forman parte de otra vía evolutiva (otro serotipo) o son genes especializados difíciles de encontrar (Webber et al., 2019).

Las cepas utilizadas en este estudio fueron recuperadas de los siguientes organismos, de acuerdo con un estudio preliminar de recuperación e identificación:

| Cepa | Organismo de procedencia | Orden o clado |
|------|--|---------------|
| 46 | <i>Crotalus triseriatus</i> | Ophidia |
| 50 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 100 | <i>Rhinoclemys pulquerrina pulquerrina</i> | Testudinos |
| 112 | <i>Pituophis deppei deppei</i> | Ophidia |
| 114 | <i>Pituophis deppei deppei</i> | Ophidia |
| 115 | <i>Boa constrictor imperator</i> | Ophidia |
| 116 | <i>Pituophis deppei deppei</i> | Ophidia |
| 122 | <i>Trachemys spp.</i> | Testudinos |
| 123 | <i>Kinosternon spp.</i> | Testudinos |
| 126 | <i>Kinosternon spp.</i> | Testudinos |
| 229 | <i>Agkistrodon bilineatus</i> | Ophidia |
| 232 | <i>Crotalus simus</i> | Ophidia |
| 237 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 240 | <i>Ctenosaura pectinata</i> | Squamata |
| 244 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 245 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 254 | <i>Ctenosaura pectinata</i> | Squamata |
| 256 | Caso clínico | nd |
| 259 | <i>Ctenosaura similis</i> | Squamata |
| 268 | <i>Ctenosaura similis</i> | Squamata |
| 276 | <i>Ctenosaura pectinata</i> | Squamata |
| 26B | Caso clínico | nd |
| 119B | <i>Crotalus atrox</i> | Ophidia |
| B3 | <i>Pituophis deppei deppei</i> | Ophidia |
| R7 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| R8 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |

| | | |
|------|-----------------------------|----------|
| R9 | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 237R | <i>Iguana iguana</i> | Squamata |
| 243R | <i>Ctenosaura pectinata</i> | Squamata |
| 259R | <i>Ctenosaura similis</i> | Squamata |
| III | Caso clínico | nd |

nd: no determinado

Materiales y métodos

Confirmación de identidad de las cepas

Las cepas recuperadas previamente se sometieron a crecimientos en medios selectivos y pruebas bioquímicas para confirmar su identidad como *Salmonella spp.* Se realizó un primer sembrado en agar McConkey, a partir de las cepas conservadas en un medio de leche y glicerol, con el fin de obtener un crecimiento de los microorganismos y una primera evaluación a partir de su morfología y del resultado lactosa positivo o negativo que nos proporciona este medio. Un segundo sembrado se realizó en medio selectivo Salmonella Shigella, para una evaluación de su morfología y producción de ácido sulfhídrico. Las pruebas bioquímicas empleadas serán Sulfuro Indol Motilidad (SIM), Citrato de Simmons (CS), Hierro Triple Azúcar (TSI, de "Triple Sugar Iron"), Agar Urea (AU) y Lisina Descarboxilasa (LD). Para estas pruebas, los resultados esperados para la identidad de las cepas como *Salmonella spp.* se muestran en la tabla 1. Debido a las dificultades que representa la producción de ácido sulfhídrico y consecuente formación del sulfuro de hierro (pigmentando de color negro el medio) la motilidad fue evaluada mediante microscopía en gota en lugar del medio SIM.

Resultados de *Salmonella spp.* en las pruebas bioquímicas por realizar.

| Medio | McConkey | Salmonella Shigella | SIM | | CS | AU | LD |
|------------------------|----------|--|------------------|-------|------------------|--------|-----------------------|
| Prueba | Lactosa | Morfología | H ₂ S | Indol | Citrato permeasa | Ureasa | Lisina descarboxilasa |
| <i>Salmonella spp.</i> | - | Centro negro y bordes claros traslúcidos | + | - | +/- | - | + |

Por la complejidad de la prueba, los posibles resultados de la TSI se describen a continuación, siendo las reacciones 2, 3 y 4 las indicadoras de *Salmonella*.

Tabla 2. Posibles resultados (reacciones) de la prueba TSI.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| Superficie | A | R | R | A | R | A |
| Fondo | A | A | A | A | R | A |

| | | | | | | |
|------------------|---|---|-----|-----|---|---|
| Gas | + | + | +/- | +/- | - | - |
| H ₂ S | - | + | - | + | - | - |

Crecimiento y recuperación de cepas confirmadas

Las cepas confirmadas fueron cultivadas en caldo de lisogenia (LB, de "Lysogeny Broth"). El medio fue dispuesto en tubos de vidrio de 20 mL, con un volumen de 10 mL por tubo. Las cepas fueron inoculadas a partir del medio TSI e incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos para obtener y conservar el pellet, desinfectando y desechando el sobrenadante.

Protocolo de extracción de ADN

A partir de los pellets obtenidos, se realizó la extracción de ADN de cada una de las cepas a partir de un protocolo de extracción por Tiocianato de Guanidina-Sílica, el cual se describe por pasos a continuación.

1. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en 2 mL de solución Tris-EDTA (TE), para después transferir 1.5 mL a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Conservar el sobrante de las suspensiones en los tubos en refrigeración.
2. Centrifugar los tubos a 4500 rpm por 10 minutos para obtener nuevamente un pellet.
3. Desechar el sobrenadante en un contenedor con hipoclorito de sodio y se conserva el pellet.
4. Añadir 500 µL de solución de lisis total y se homogeniza hasta que la mezcla se vuelva cristalina, permitiendo después reposar en hielo por 10 minutos.
5. Añadir 30 µL de sílica a la mezcla, homogeneizar a y permitir que repose en hielo por 10 minutos.
6. Centrifugar los tubos a 10000 rpm por 45 segundos y transferir el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL para su conservación en congelación, conservando la pastilla sílica.
7. Añadir 500 µL de etanol frío al 70% y homogeneizar hasta que la pastilla este completamente desintegrada y resuspendida.
8. Centrifugar a 10000 rpm durante 45 s, recuperando la pastilla sílica y desechando el sobrenadante.
9. Añadir 500 µL de acetona fría y homogeneizar hasta que la pastilla esté completamente desintegrada y resuspendida.
10. Centrifugar a 10000 rpm durante 45 s, recuperando la pastilla sílica y desechando el sobrenadante.
11. Colocar los tubos abiertos en una incubadora a 37°C durante 10 minutos o hasta que la pastilla se seque.
12. Añadir 50 µL de solución TE a la pastilla y homogeneizar.
13. Calentar los tubos a 56°C durante 10 minutos.
14. Centrifugar los tubos a 13000 rpm por 2 min.
15. Recuperar el sobrenadante (conteniendo el ADN) evitando que se enfríe y transferir a un tubo de 0.5 mL conservando ambos tubos en congelación.

Confirmación de la presencia de ADN

Se evaluó la presencia e integridad de ADN en las extracciones por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, solución TAE 1X, a 70 V por 40 minutos.

Protocolo de purificación de ADN con CTAB-NaCl

1. Agregar a la muestra volumen suficiente de TE para alcanzar 200 μ L.
2. Mantener la muestra a 56°C por 10 minutos y homogeneizar perfectamente.
3. Adicionar 30 μ L de CTAB-NaCl (previamente atemperado a 65°C a baño maría).
4. Homogeneizar perfectamente.
5. Incubar la muestra por 10 minutos a 65°C.
6. Agregar 200 μ L de fenol/cloroformo (1:1).
7. Homogeneizar perfectamente.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
9. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa) en otro microtubo, cuidando de no traer nada de la interfaz.
10. Agregar 200 μ L de cloroformo al sobrenadante recuperado.
11. Homogeneizar perfectamente.
12. Centrifugar a 14000 rpm por 1 minuto.
13. Recuperar el sobrenadante (fase acuosa) en otro microtubo, cuidando de no traer nada de la interfaz.
14. Colocar la muestra 5 minutos a 37°C con la tapa abierta para que se volatilice el cloroformo.
15. Conservar en congelación hasta su uso.

Protocolo de purificación de ADN con CTAB-NaCl

1. Agregar solución TE hasta conseguir un volumen de 50 μ L.
2. Agregar 1 μ L de la solución con RNAsas a los tubos con ADN.
3. Homogeneizar con la punta.
4. Incubar a 37°C por 1 hora.
5. Conservar en congelación hasta su uso.

Quantificación de ADN

Se evaluó la concentración de ADN por medio de espectrofotometría UV-Vis a 260/280 nm; factor de concentración de 45; factor de dilución de 100.

Evaluación de la presencia de genes fimbriales por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de "Polymerase Chain Reaction")

Las muestras de ADN purificado fueron sometidas a pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para determinar la presencia de los 11 genes fimbriales a evaluar. Las condiciones y especificaciones para cada reacción se describen a continuación:

| Gen | Secuencia de primers (Forward/Reverse) | Condiciones de ciclo | Producto esperado (pb) | Secuencia de referencia (NCBI) |
|-------------|---|---|------------------------|--------------------------------|
| <i>pegA</i> | 5'TATTTAGCAATGATCACAGGCTC3'/ 5'TATTTATACGAAACGGCGTATTG3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 520 | CP107010.1 |
| <i>lpfA</i> | 5'ATGGAGTTTTTAATGAAAAAGGTT3'/ 5'GGACAGGTTGAAGTCCACTT3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 528 | CP107010.1 |
| <i>steA</i> | 5'ATGGGAATTGTCTCCGG3'/ 5'ACAGGTAAGAGATAGTGACGTTG3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 537 | CP060676.1 |
| <i>sefA</i> | 5'ATGCGTAAATCAGCATCTGC3'/ 5'ATACTGCTGAACGTAGAAGGTCG3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 488 | CP060678.1 |
| <i>sthA</i> | 5'ATGCAGTCGTCATAGGGTC3'/ 5'ATTGAGTCGCTGTCATAAATGC3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 506 | CP060668.1 |
| <i>stfA</i> | 5'ATGAATACAGCAGTAAAAGCTG3'/ 5'ATCGTGAAGTTTACGGTGC3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 548 | CP060678.1 |
| <i>stdA</i> | 5'ATGCGTAATAAAATAATACTTGCC3'/ 5'ATTTCAAGGTGTAGGTGACG3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 553 | CP060676.1 |
| <i>bcfA</i> | 5'ATGAAAAAGCCTGTACTAGCATTAAAT3'/ 5'GGAATAAACCATGCTAAATGTCG3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 540 | CP060676.1 |
| <i>fimA</i> | 5'ATGACCTCTACTATTGCGAGTCT3'/ 5'ATGATAAAGGTGGCGTGC3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 520 | CP060676.1 |
| <i>stiA</i> | 5'ATGAACTCTCCTTAAAAACTCAC3'/ 5'CAGTTATATTGCAGATAGAATGTTGC3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 45 s, 72°C 1 min; 1 ciclo 72°C 5 min | 539 | CP060678.1 |
| <i>stbA</i> | 5'ATGGCTGTTTCTGATAACACC3'/ 5'CAGCGACTGTCCCAGC3' | 1 ciclo 95°C 2 min; 30 ciclos 94°C 1 min, 56°C 30 s, 72°C 45 s; 1 ciclo 72°C 5 min | 444 | CP060678.1 |

Confirmación de la amplificación de gen

La amplificación de los genes buscados fue evaluada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, en solución TAE 1X, a 70 V por 1 hora.

Resultados

Identificación del género *Salmonella* mediante prueba bioquímicas:

| Medio | McCon key | SIM | | CS | TSI | | | | AU | LD |
|----------------|-----------|------------------|-------|---------|-------------------|-------------|------------------|-----|------|-----------------------|
| Prueba Cepa | Lactosa | H ₂ S | Indol | Citrato | Color superficial | Color fondo | H ₂ S | Gas | Urea | Lisina descarboxilasa |
| 46 | - | + | - | - | R | I | + | + | - | + |
| 50 | - | + | - | - | A | R | + | + | - | + |
| 50 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 60 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | - |
| 74 | + | + | - | + | A | A | + | + | - | - |
| 83 | + | + | - | + | A | A | + | + | - | - |
| 100 | - | + | - | + | A | I | + | + | - | + |
| 112 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 114 | - | + | - | + | A | I | + | - | - | + |
| 115 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 116 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 119 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | - |
| 122 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 123 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 124 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | - |
| 126 | - | + | - | - | R | I | + | + | - | + |
| 133 | - | - | - | - | R | A | + | + | - | + |
| 134 | + | + | - | + | A | A | + | + | - | - |
| 139 | + | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 139 | - | + | - | + | R | A | + | - | - | + |
| 157 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | - |
| 160 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | - |
| 222 | + | + | - | + | A | A | + | + | - | - |
| 226 | + | + | - | + | A | I | + | + | - | + |
| 226 | + | + | - | + | A | A | + | + | - | + |
| 229 | - | + | - | + | A | A | + | + | - | + |
| 232 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 236 | + | + | - | + | A | A | - | + | - | + |
| 237 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 240 | - | + | - | + | A | A | + | - | - | + |
| 243 | - | + | - | + | R | A | + | - | - | + |
| 244 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 245 | - | + | - | + | A | I | + | + | - | + |
| 254 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 256 | - | + | - | + | A | A | + | + | - | + |
| 259 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 268 | - | + | - | + | A | I | + | + | - | + |
| 276 | - | + | - | + | A | A | + | - | - | + |
| I-1 | - | + | - | + | R | I | + | - | - | + |
| I10T2 | + | + | - | - | A | A | + | + | - | - |

| | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 130 A | + | + | - | - | A | A | + | + | - | + |
| 26B | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 119B | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| B3 | - | + | - | + | A | A | + | + | - | + |
| R7 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| R8 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| R8R | - | + | - | + | R | A | + | - | - | + |
| R9 | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 237R | - | + | - | + | A | I | + | + | - | + |
| 243R | - | + | - | + | R | I | + | + | - | + |
| 259R | - | + | - | - | A | I | + | - | - | + |
| III | - | + | - | + | R | A | + | + | - | + |

Simbología:

+ Positivo

- Negativo

R Rojo (pH básico)

A Amarillo (pH ácido)

I Indeterminable por la presencia del pigmento negro

Posteriormente, tras elegir las 31 (32 menos la segunda cepa 50 repetida) de *Salmonella* confirmadas, se determinó la motilidad de estas por medio de observación en gota en microscopio óptico a 100X, confirmando la motilidad de las 31 cepas.

Resultados de la cuantificación por espectrofotometría de las muestras de ADN extraídas.

| Cepa | Concentración (µg/mL) | Abs λ260 | Abs λ280 | Relación |
|------|-----------------------|----------|----------|----------|
| 46 | 14.381 | 0.003 | 0.002 | 1.30 |
| 50 | 19.448 | 0.003 | 0.002 | 1.32 |
| 100 | 34.146 | 0.015 | 0.012 | 1.22 |
| 112 | 31.019 | 0.014 | 0.011 | 1.25 |
| 114 | 27.778 | 0.012 | 0.010 | 1.20 |
| 115 | 19.739 | 0.009 | 0.006 | 1.52 |
| 116 | 64.216 | 0.029 | 0.022 | 1.31 |
| 122 | 29.150 | 0.013 | 0.013 | 1.02 |
| 123 | 73.721 | 0.033 | 0.028 | 1.16 |
| 126 | 90.805 | 0.040 | 0.035 | 1.15 |
| 229 | 16.701 | 0.007 | 0.008 | 0.99 |
| 232 | 37.362 | 0.017 | 0.015 | 1.09 |
| 237 | 10.407 | 0.005 | 0.005 | 1.01 |
| 240 | 93.352 | 0.041 | 0.038 | 1.08 |
| 244 | 66.527 | 0.030 | 0.029 | 1.03 |
| 245 | 31.196 | 0.014 | 0.015 | 0.95 |

| | | | | |
|---------|--------|-------|-------|------|
| 254 | 14.529 | 0.006 | 0.008 | 0.85 |
| 256 | 29.297 | 0.013 | 0.010 | 1.29 |
| 259 | 22.162 | 0.010 | 0.010 | 1.00 |
| 268 | 11.729 | 0.005 | 0.004 | 1.35 |
| 276 | 12.084 | 0.005 | 0.004 | 1.27 |
| 26B | 24.300 | 0.011 | 0.008 | 1.30 |
| 119B | 31.730 | 0.014 | 0.013 | 1.10 |
| B3 | 12.504 | 0.006 | 0.006 | 1.02 |
| R7 | 13.329 | 0.006 | 0.005 | 1.12 |
| R8 | 18.989 | 0.009 | 0.008 | 1.16 |
| R9 | 15.426 | 0.007 | 0.007 | 0.99 |
| 237R | 30.100 | 0.013 | 0.013 | 1.06 |
| 243R | 40.218 | 0.018 | 0.017 | 1.04 |
| 259R | 17.980 | 0.008 | 0.007 | 1.09 |
| III | 11.468 | 0.005 | 0.005 | 1.04 |
| Control | 98.276 | 0.044 | 0.029 | 1.45 |

Resultados de la determinación de la presencia de genes de virulencia en las cepas analizadas mediante PCR y electroforesis:

| Gen \ Cepa | <i>pegA</i> | <i>lpfA</i> | <i>steA</i> | <i>sefA</i> | <i>sthA</i> | <i>stfA</i> | <i>stdA</i> | <i>bcfA</i> | <i>fimA</i> | <i>stiA</i> | <i>stbA</i> |
|---------------------------------|-------------|-------------|---|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
| 46 | - | - | V | - | + | - | - | + | + | - | V |
| 50 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 100 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 112 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 114 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 115 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 116 | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| 122 | + | + | V | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 123 | + | + | + | V | + | + | + | + | + | + | + |
| 126 | + | + | + | V | + | + | + | + | + | + | + |
| 229 | - | - | V | - | + | - | - | + | + | - | VVV /+ |
| 232 | + | - | V | - | + | - | + | + | + | + | + |
| 237 | + | - | V | - | + | - | + | + | + | + | + |
| 240 | + | - | V | V | + | V | + | + | + | + | + |
| 244 | + | - | V | - | + | - | + | + | + | + | + |
| 245 | + | - | V | - | + | - | + | + | + | + | + |
| 254 | + | - | V | V | + | - | + | + | + | + | + |
| 256 | + | + | + | V | + | + | + | + | + | + | + |
| 259 | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| 268 | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| 276 | + | - | VVV | - | + | + | + | + | + | + | + |
| 26B | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| 119B | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| B3 | - | - | V | VVVV | + | V | V / + | - | + | - | V |
| R7 | V | - | V | VVVV | + | V | + | - | + | - | VV |
| R8 | V | - | V | VVV | + | V | + | - | + | - | VV |
| R9 | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| 237R | + | - | V | - | + | V | + | + | - | + | + |
| 243R | + | - | V | - | + | V | + | + | + | + | + |
| 259R | + | - | V | V | + | V | + | + | + | + | + |
| III | + | + | V | VV | + | + | + | + | + | + | + |
| Control | + | + | V | VVV | + | + | + | + | + | + | + |
| Peso molecular aprox. de V (pb) | 2500 | | 800 (V) 350 / 400 / 800 (VVV) | 1300 (V) 240, 254, 256) 1650 (V) 123, 126) 650 (259R) 900 / 1650 (VV) | | 800 | 900 | | | | 2500 (V,46) 700 (V, B3) 700 / 2500 (VV) 700 / 1500 / 2500 (VVV) |

| | | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | | 650 / 1300 (VV III) | | | | | | |
| | | | | 650 / 1300 / 1450 (VVV R8) | | | | | | |
| | | | | 570 / 650 / 1300 (VVV C+) | | | | | | |
| | | | | 650 / 900 / 1300 / 1450 (VVVV) | | | | | | |

Simbología:

- + Presencia del gen. Hubo amplificación (sin importar la concentración del amplicón / intensidad de la banda)
- Ausencia del gen, no hubo amplificación
- V Hubo amplificación, pero el peso / tamaño del producto es distinto al esperado

El gen **sthA** fue el único presente en el 100% las cepas. El gen **fimA** estuvo presente en el 96.8% de las cepas. El gen **bcfA** estuvo presente en el 90.3% de las cepas. El gen **stiA** estuvo presente en el 83.9% de las cepas. El gen **lpfA** estuvo presente en el 38.7% de las cepas. Algunas de las reacciones mostraron productos de un peso molecular distinto al esperado. En el caso del gen **sefA** no se encontraron amplificaciones del peso molecular esperado. La cepa 259R presentó una banda de 650 pb. Las cepas 240, 254 y 256 presentaron una banda de 1300 pb. Las cepas 123 y 126 presentaron una banda de 1650 pb. Las cepas 50, 100, 112, 114, 115 y 116 presentaron dos bandas de 900 y 1650 pb. La cepa III presentó dos bandas de 650 y 1300 pb. La cepa R8 presentó 3 bandas de 650, 1300 y 1450 pb. Las cepas B3 y R7 presentaron 4 bandas de 650, 900, 1300 y 1450 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP060678.1). Se recomienda realizar un nuevo diseño de primers, preferentemente de otro gen del FGC (*sefABCDR*), para confirmar la presencia de *sef*. Una alternativa es aumentar el rango de análisis diseñando los primers para amplificar un área mayor, río arriba y río abajo de *sefA*. El gen **steA** estuvo presente en el 9.7% de las cepas. Las cepas restantes (90.3%) presentaron amplificaciones de tamaño inesperado con un peso de 800 pb. La cepa 276 presentó 3 bandas de amplificación inesperada, cuyos pesos corresponden a 800, 400 y 350 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP060676.1). El gen **stfA** estuvo presente en el 41.9% y ausente en el 22.6% de las cepas. Las cepas restantes (35.5%) presentaron amplificaciones de tamaño inesperado con un peso de 800 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP060678.1). El gen **stdA** estuvo presente en el 93.5% y ausente en el 6.5% de las cepas. La cepa B3 presentó dos bandas, una banda del tamaño esperado y otra de 900 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP060676.1). El gen **stbA** estuvo presente en el 87% de las cepas. La cepa 229

presentó, además de la banda esperada, 3 bandas de 700, 1500 y 2500 pb. La cepa 46 presentó una banda de 2500 pb. La cepa B3 presentó una banda de 700 pb. Las cepas R7 y R8 presentaron dos bandas de 700 y 2500 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP060678.1). El gen *pegA* estuvo presente en el 83.9% y ausente en el 9.6% de las cepas. Las cepas R7 y R8 (6.5%) presentaron una banda de 2500 pb. En el análisis *in silico* se encontró que sólo existe un sitio de unión con 100% de coincidencia para cada primer en el genoma de *Salmonella* (NCBI, CP107010.1).

Discusión

En este trabajo se logró amplificar secuencias correspondientes a 11 operones fimbriales descritos para *Salmonella* spp. Los resultados de la amplificación para algunos genes mostraron tamaños variables. Una de las posibles causas de la aparición de productos no esperados podría ser la existencia de secuencias repetidas invertidas que puedan generar horquillas. **Potaman** describe cómo la existencia de secuencias complementarias invertidas dentro del área de amplificación puede generar una horquilla que funciona como primer para la amplificación de un producto más largo del esperado. Entre más larga sea la secuencia complementaria, más grande será la diferencia de tamaño entre el producto esperado y el obtenido. Se recomienda hacer un nuevo análisis *in silico* para buscar este tipo de secuencias en el extremo 3' del amplicón esperado en cada caso. Este análisis puede realizarse también a partir de la secuenciación de los productos. **Ohnishi** y colaboradores reportan amplificaciones de tamaños no esperados en un análisis genómico de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157. La secuenciación y análisis de los amplicones mostró que existe una diversidad genómica importante entre individuos de la misma cepa, presentando una estructura y orden distintos. Esta diversidad fue principalmente asociada a la presencia de profagos de integridad y localización variables (**Ohnishi et al., 2002**). Los bacteriófagos son entidades biológicas capaces de integrar su genoma a un genoma bacteriano y transmitir su secuencia de forma vertical durante la duplicación del hospedero (**Alberts et al., 2008**). Se ha identificado diversos sitios de inserción para profagos, entre los que se favorecen genes de ARN no codificante, en menor medida sitios intergénicos y aún con menor frecuencia dentro de genes codificantes de proteínas (**Wahl et al., 2019**). Los eventos de recombinación dados por enzimas del fago y la bacteria generan modificaciones en las secuencias de profagos (**Wahl et al., 2019**). Las modificaciones de la secuencia en profagos pueden reducir considerablemente el tamaño de su genoma y en muchos casos perder su capacidad de escindirse del genoma bacteriano para continuar su ciclo lisogénico (**Wahl et al., 2019**). La longitud de las secuencias de profagos oscila entre 17 y 36 kb (**Loh et al., 2020**). Es posible que las amplificaciones de mayor tamaño obtenidas en el presente trabajo se expliquen por secuencias de profagos (fragmentos) insertadas dentro de las secuencias analizadas. Se recomienda realizar la secuenciación de los productos no esperados y el análisis de la secuencia obtenida para determinar si existen secuencias de profago en los amplicones. Se han descrito otros procesos biológicos que podrían explicar la obtención de productos de tamaños no esperados o la obtención de más de una banda, entre los que se encuentran elementos transponibles y duplicación genética (**Del Castillo et al., 2019**). **Barquist** y colaboradores encontraron 549086 sitios de inserción de elementos transponibles en *S. Typhimurium* y 371775 en *S. Typhi*. La inserción intragénica de elementos transponibles es relativamente común, estimándose cerca de 100 sitios de inserción por gen. En el caso de *S. Typhi* se han encontrado 57 genes que no poseen sitios de inserción y que están relacionados con procesos celulares fundamentales. El

tamaño de los transposones oscila entre unas 6 kb y 200 b aproximadamente (**Pray, 2008**). Es posible que las amplificaciones de mayor tamaño obtenidas en el presente trabajo se expliquen por la inserción de secuencias transponibles dentro de las secuencias analizadas. Se recomienda realizar la secuenciación de los productos no esperados y el análisis de la secuencia obtenida para determinar si existen secuencias transponibles dentro de los genes evaluados. Los eventos de duplicación en tándem son frecuentes en bacterias y fagos. La frecuencia de eventos de duplicación espontánea es altamente variable a lo largo del genoma bacteriano. Las regiones más susceptibles a la duplicación se localizan entre genes de ARN ribosomal. Se han descrito individuos de *E. coli* con un 6% de su genoma conformado por duplicaciones en tándem. Se ha propuesto que estos eventos se dan por procesos de recombinación homóloga ilegítima, donde existen desfases en el emparejamiento de las secuencias homólogas y pueden ocurrir duplicaciones o deleciones (**Anderson & Roth, 1981**). Es posible que las amplificaciones de dos o más bandas o las amplificaciones de tamaños no esperados obtenidas en el presente trabajo se expliquen por eventos de duplicación. Se recomienda realizar la secuenciación de los productos no esperados y el análisis de la secuencia obtenida para determinar si existen secuencias duplicadas. Este análisis permitirá confirmar que estas amplificaciones no esperadas corresponden a los *loci* que se desean amplificar. En caso de corresponder estos productos al gen esperado, se podrá determinar también si las cepas poseen un gen funcional o no dependiendo de las variantes encontradas.

Por el caso particular de *sefA*, los resultados de este gen no se tomaron en cuenta para el análisis de los genes presentes en cada cepa. Las cepas 123, 126 y 256 presentan todos los genes de virulencia. Las cepas 123 y 126 son ambas procedentes de *Kinosternon* (testudino). Las cepas 50, 100, 112, 114, 115, 116, 122, III y el control (*Salmonella enterica* Typhimurium) también presentan todos los genes, pero se presenta como una variante en el caso de *steA*. Los organismos de procedencia de estas cepas son muy variados (testudinos, ofidios y escamosos). Las cepas que presentan menor cantidad de genes son las 46 y 229, siendo positivas para *sthA*, *fimA* y *bcfA*, y presentando variantes en *stbA*. Aunque de especies distintas, ambas cepas son procedentes de ofidios. Las cepas 232, 237, 244 y 245 fueron negativas para *lpfA*, *sefA* y *stfA*, presentando variante en *steA*. La primera cepa es procedente de *Crotalus* (ofidio), mientras que las últimas tres son procedentes de *Iguana* (escamoso). Las cepas 240, 259, 268, 26B, 119B, R9, 243R y 259R fueron negativas para *lpfA* y *sefA*, presentando variantes en *stfA* y *steA*. La procedencia de estas cepas es muy variada (ofidios y escamosos). No fue posible encontrar una relación directa entre los organismos de procedencia y la presencia de genes fimbriales en la cepa recuperada.

A partir de la literatura, **Wallis y Barrow** sugieren que los serotipos hospedero-específicos y causantes de enfermedades sistémicas poseen una capacidad pobre para colonizar el intestino (Typhi y Paratyphi). Por otra parte, **Weening** y colaboradores encontraron que la deleción individual de *bcf*, *std*, *sth* y *stb* impactó negativamente en la habilidad de *S. Typhimurium* para eliminarse del hospedero a través de las heces y de colonizar el ciego tras 30 días de infección en modelo murino. Con esta información se podría relacionar la presencia de estos genes con la capacidad de colonizar el intestino, como se describió para los serotipos Typhi y Paratyphi. Cepas con presencia de *bcf*, *std*, *sth* y *stb* podrían categorizarse como más propensas a producir gastroenteritis, al estar preparadas para colonizar el intestino y diseminarse por medio de las heces, siendo más probable que sean las causantes de infecciones entéricas que infecciones sistémicas. Sin embargo, es necesario en este punto considerar que existen otros factores de virulencia que podrían mostrar efectos sinérgicos,

además de que la regulación de la expresión de genes debido al microambiente intestinal único del hospedero podría alterar la virulencia de las cepas. **Van Der Velden** y colaboradores describen casos donde la delección individual de *invA* y *lpfC* causó un aumento de 5 y 15 veces la dosis letal 50 (DL50), respectivamente, mientras que la delección de ambos genes aumentó 150 veces la DL50. De la misma manera se encontró que la delección del *lpfC* causó un aumento de casi 5 veces la DL50, mientras que la delección de *fim*, *lpfC*, *pefC* y *agfB* causó un aumento de 26 veces la DL50. Estos investigadores observaron también que mutantes con delección de las cuatro fimbrias expresaron una fimbria no identificada en ese momento, posiblemente como un mecanismo de virulencia alternativo. Los resultados de **Van Der Velden** y colaboradores demuestran la importancia de los efectos sinérgicos entre distintos genes y la capacidad de expresión de factores de virulencia alternativos, haciendo difícil la categorización de la virulencia de las cepas sólo con el conocimiento de la presencia de algunos genes fimbriales. La serotipificación puede ser de ayuda para identificar cepas hospedero específicas (Gallinarum para pollo, Typhi y Paratyphi para humanos) o cepas con una amplia variedad de hospederos potenciales (Typhimurium y Enteritidis). **Clayton** y colaboradores describen la tendencia de las cepas hospedero-específicas y no específicas para causar infecciones sistémicas o infecciones entéricas, respectivamente. **Mitchel y Shane** describen que existen especies de *Salmonella* especializadas en el microambiente intestinal de reptiles, como es el caso de *Salmonella panama* y *Salmonella meleagridis*. **Ackman** y colaboradores, por otro lado, describen serotipos de *S. enterica* encontrados en cuadros de salmonelosis en humanos asociados a contacto con reptiles. Los serotipos encontrados fueron *S. Poona*, *S. Cerro*, *S. Irimu*, *S. Litchfield*, *S. Stanley*, *S. Eastbourne*, *S. Urbana*, *S. Paratyphi* y 11 serotipos desconocidos de las subespecies III y IV. Son pocos los serotipos hospedero específicos e incluso para estos existen casos de zoonosis procedentes de reptiles. Casos de zoonosis con *S. Paratyphi* indican la capacidad de este serotipo para sobrevivir en reptiles a pesar de su selectividad de hospedero para causar infección (**Ackman et al., 1995**). Se recomienda realizar una serotipificación a las 31 cepas del presente trabajo para determinar su potencial zoonótico y establecer relaciones serotipo-presencia de genes fimbriales. Algunos genes podrían servir como identificadores de ciertos serotipos. **Clayton** y colaboradores identifican el FGC *peg* como un operón diferencial, presente sólo en *S. Gallinarum*, *Enteritidis* y *Paratyphi*. En los resultados del presente trabajo se encontraron 26 cepas (83.9%) con presencia de *pegA*, además del control (*Salmonella enterica* Typhimurium). El FGC *stc* se plantea como un operón presente en *S. Typhimurium* que posee un 60 a 70% de homología con la secuencia de *peg*, encontrándose además en la misma posición cromosómica (**Clayton et al., 2008**). En el análisis *in silico* se encontró un 62% de homología entre las secuencias de *pegA* y *stcA* (NCBI. *pegA* ID: 11824140; *stcA* ID: 1253673). Se recomienda realizar la secuenciación de los productos de *pegA* para determinar si algunas de las amplificaciones corresponden a *stcA*. A partir de estos resultados también puede realizarse una serotipificación de las cepas, para confirmar la especificidad de *peg* para los serotipos *Gallinarum*, *Enteritidis* y *Paratyphi*. **Cheng** y colaboradores describen al FGC *sth* como un grupo marcador de la especie *S. bonogori* y la mayor parte de las subespecies de *S. enterica*, siendo ausente en *arizonae* y *diarizonae*. Siendo *sthA* el único gen presente en todas las cepas del presente trabajo, puede pensarse en discriminar las subespecies *arizonae* y *diarizonae* de las 31 cepas analizadas.

Es necesario seguir trabajando con estas cepas para obtener más datos que hagan posible un correcto análisis de su potencial zoonótico y la regulación de la expresión de los genes que poseen en condiciones similares al microambiente gastrointestinal humano.

Bibliografia

1. Rehman, T., Yin, L., Latif, M. B., Chen, J., Wang, K., Geng, Y., ... & Ouyang, P. (2019). Adhesive mechanism of different Salmonella fimbrial adhesins. *Microbial pathogenesis*, 137, 103748.
2. Linke, D., & Goldman, A. (2011). Bacterial adhesion (pp. 17-29). Springer.
3. Webber, B., Borges, K. A., Furian, T. Q., Rizzo, N. N., Tondo, E. C., Santos, L. R. D., ... & Nascimento, V. P. D. (2019). Detection of virulence genes in Salmonella Heidelberg isolated from chicken carcasses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 61.
4. Clayton, D. J., Bowen, A. J., Hulme, S. D., Buckley, A. M., Deacon, V. L., Thomson, N. R., ... & Stevens, M. P. (2008). Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by Salmonella enterica serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC microbiology*, 8(1), 1-15.
5. Bäumlér, A. J., & Heffron, F. (1995). Identification and sequence analysis of IpfABCDE, a putative fimbrial operon of Salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 177(8), 2087-2097.
6. Quan, G., Xia, P., Zhao, J., Zhu, C., Meng, X., Yang, Y., ... & Zhu, G. (2019). Fimbriae and related receptors for Salmonella Enteritidis. *Microbial pathogenesis*, 126, 357-362.
7. Edwards, R. A., Schifferli, D. M., & Maloy, S. R. (2000). A role for Salmonella fimbriae in intraperitoneal infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1258-1262.
8. Ledebøer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M., & Jones, B. D. (2006). Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and immunity*, 74(6), 3156-3169.
9. Zhou, M., Ding, X., Ma, F., Xu, Y., Zhang, J., Zhu, G., & Lu, Y. (2019). Long polar fimbriae contribute to pathogenic Escherichia coli infection to host cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7317-7324.
10. Cheng, R. A., & Wiedmann, M. (2021). Recent Advances in Our Understanding of the Diversity and Roles of Chaperone-Usher Fimbriae in Facilitating Salmonella Host and Tissue Tropism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 628043.
11. Suwandi, A., Galeev, A., Riedel, R., Sharma, S., Seeger, K., Sterzenbach, T., ... & Grassl, G. A. (2019). Std fimbriae-fucose interaction increases Salmonella-induced intestinal inflammation and prolongs colonization. *PLoS pathogens*, 15(7), e1007915.
12. De Masi, L., Yue, M., Hu, C., Rakov, A. V., Rankin, S. C., & Schifferli, D. M. (2017). Cooperation of adhesin alleles in Salmonella-host tropism. *Msphere*, 2(2), e00066-17.
13. Weening, E. H., Barker, J. D., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Tsolis, R. M., & Bäumlér, A. J. (2005). The Salmonella enterica serotype Typhimurium Ipf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infection and immunity*, 73(6), 3358-3366.
14. Łaniewski, P., Baek, C. H., Roland, K. L., & Curtiss III, R. (2017). Analysis of spleen-induced fimbria production in recombinant attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine strains. *MBio*, 8(4), e01189-17.
15. Clayton, D. J., Bowen, A. J., Hulme, S. D., Buckley, A. M., Deacon, V. L., Thomson, N. R., ... & Stevens, M. P. (2008). Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation

- of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC microbiology*, 8(1), 1-15.
16. Potaman, V. N. (1999). Prevention of unexpectedly long PCR products primed at short inverted repeats. *Biotechniques*, 27(6), 1110-1114.
 17. Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., ... & Hayashi, T. (2002). Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17043-17048.
 18. Joshi, M., & Deshpande, J. D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
 19. Barquist, L., Langridge, G. C., Turner, D. J., Phan, M. D., Turner, A. K., Bateman, A., ... & Gardner, P. P. (2013). A comparison of dense transposon insertion libraries in the *Salmonella* serovars Typhi and Typhimurium. *Nucleic acids research*, 41(8), 4549-4564.
 20. Pray, L. A. (2008). Transposons: The jumping genes. *Nature education*, 1(1), 204.
 21. Alberts, B. et al. (2008) *Molecular biology of the cell*. 5th edn. New York, NY: Garland Science.
 22. Wahl, A., Battesti, A., & Ansaldi, M. (2019). Prophages in *Salmonella enterica*: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host?. *Molecular microbiology*, 111(2), 303-316.
 23. Loh, B., Chen, J., Manohar, P., Yu, Y., Hua, X., & Leptihn, S. (2020). A biological inventory of prophages in *A. baumannii* genomes reveal distinct distributions in classes, length, and genomic positions. *Frontiers in microbiology*, 11, 579802.
 24. Rocha, E. P. (2003). An appraisal of the potential for illegitimate recombination in bacterial genomes and its consequences: from duplications to genome reduction. *Genome research*, 13(6a), 1123-1132.
 25. Wallis, T. S., & Barrow, P. A. (2005). *Salmonella* epidemiology and pathogenesis in food-producing animals. *EcoSal Plus*, 1(2).
 26. Van Der Velden, A. W., Bäumlner, A. J., Tsohis, R. M., & Heffron, F. (1998). Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infection and immunity*, 66(6), 2803-2808.
 27. Mitchell, M. A., & Shane, S. M. (2001, January). *Salmonella* in reptiles. In *Seminars in avian and exotic pet medicine* (Vol. 10, No. 1, pp. 25-35). WB Saunders.
 28. Ackman, D. M., Drabkin, P., Birkhead, G., & Cieslak, P. (1995). Reptile-associated salmonellosis in New York state. *The Pediatric infectious disease journal*, 14(11), 955-958.
 29. Del Castillo, R.V., Dulijh U.H.R and Zafra, de la R.G. (2019) *Genética Clínica* (2a. Ed.). Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno.



VoBo. Daniel Martínez Gómez (30356)



VoBo. Estela T. Méndez Olvera (29747)