



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Caracterización genómica de la capacidad virulenta de
una cepa de Salmonella Typhimurium aislada de Cavia
porcellus (cuy)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Marjorie Andrea ALEMAN ALVARADO

ASESOR

Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Aleman, M. (2019). *Caracterización genómica de la capacidad virulenta de una cepa de Salmonella Typhimurium aislada de Cavia porcellus (cuy)*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

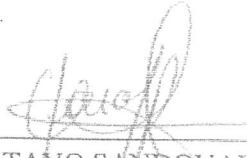
Siendo las *11:20* horas del 11 de enero de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga de MARJORIE ANDREA ALEMAN ALVARADO.


Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 019-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: "CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE LA CAPACIDAD VIRULENTE DE UNA CEPA DE *Salmonella Typhimurium* AISLADA DE *Cavia porcellus* (CUY)", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota *1.9*...., calificativo: *Aprobado con méritos honores*


Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga a MARJORIE ANDREA ALEMAN ALVARADO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

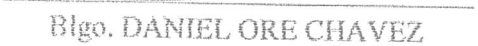
Siendo las *12:20* horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 11 de enero de 2019.


Mg. GUSTAVO SANDOVAL PEÑA
(PRESIDENTE)


Dr. LENIN MATURRANO HERNANDEZ
(ASESOR)


Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)


Blgo. DANIEL ORE CHAVEZ
(MIEMBRO)

*A mis padres y hermana
por el apoyo y el cariño brindado
durante toda mi carrera universitaria,
GRACIAS!*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi asesor Dr. Lenin Maturrano Hernández por la confianza depositada en el desarrollo de esta tesis, así como en los proyectos del laboratorio; gracias por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y por haber fomentado en mí la curiosidad por la Bioinformática.

Al Dr. Raúl Rosadio Alcántara, líder del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, por el apoyo e interés brindado en mi desarrollo académico y profesional; por siempre exigirme más.

Agradezco también a mis amigos del Laboratorio de Biología y Genética Molecular, especialmente a Raquel Hurtado, por hacerme ingresar al mundo de la Bioinformática, a Raquel Quino, Marcos Almeyda, Juan Siuce, Carla Duran y Susana Asencios, por el ánimo y amistad que recibí durante el desarrollo de esta tesis.

Por último, el presente estudio fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad – Innóvate Perú como parte del Proyecto N° 362-PNICP-PIAP-2014: “Desarrollo de una vacuna para el control y prevención de la salmonelosis en la producción de cuyes”.

The logo for Innóvate Perú features the word "Innóvate" in a bold, red, sans-serif font. The letter "ó" has a red accent mark above it. To the right of "Innóvate", the word "Perú" is written vertically in a smaller, red, sans-serif font.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

	pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Salmonelosis en cuyes.....	4
2.1.1 Generalidades	4
2.1.2 Agente etiológico	5
2.1.3 Signos clínicos.....	6
2.2 <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	9
2.2.1 Características generales	9
2.2.2 Clasificación y nomenclatura	10
2.2.3 Patogénesis.....	12
2.2.4 Factores de virulencia.....	15
2.2.4.1 Factores de colonización (fimbrias y adhesinas)	16
2.2.4.2 Islas de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> (SPIs)	17
2.2.4.3 Lipopolisacáridos (LPS).....	21
2.2.4.4 Flagelo	22
2.3 Genómica.....	23
2.3.1 Secuenciamiento Illumina HiSeq	23
2.3.2 Análisis <i>in silico</i> de genomas	24
2.3.2.1 Ensamblaje	24
2.3.2.2 Anotación	25
2.3.2.3 Identificación de factores de virulencia	26

2.3.3 Características generales del genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium	29
2.4 Herramientas bioinformáticas utilizadas	31
2.4.1 Prokka versión 1.12	31
2.4.2 BLAST versión 2.7.1	32
2.4.3 BLAST Ring Image Generator (BRIG)	33
2.4.4 PHASTER	33
2.4.5 PlasmidFinder versión 2.0	33
2.5 Bases de datos	34
2.5.1 UniProt	34
2.5.2 Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB)	35
2.5.3 Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos (CARD).....	35
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
3.1 Hipótesis.....	37
3.2 Objetivos	37
3.2.1 Objetivo General.....	37
3.2.2 Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL Y MÉTODOS	38
4.1 Información Genómica	38
4.2 Material de laboratorio	38
4.3 Métodos	39
4.3.1 Aislamiento e identificación molecular de la cepa bacteriana.....	39
4.3.2 Diseño del flujo de trabajo	39
4.3.3 Secuenciamiento total del genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium VET1.....	41
4.3.4 Ensamblaje y Anotación del genoma.....	41
4.3.5 Mapeo genómico	42
4.3.6 <i>Multi Locus Sequence Type</i> (MLST)	42
4.3.7 Identificación de factores de virulencia	43

4.3.8	Identificación de determinantes de resistencia a antibióticos	43
4.3.9	Identificación de profagos y plásmidos	44
5.	RESULTADOS	45
5.1	Anotación estructural y funcional	45
5.2	Análisis de MLST.....	46
5.3	Mapeo genómico	46
5.4	Identificación de factores de virulencia	47
5.5	Identificación de determinantes de resistencia a antibióticos	49
5.6	Identificación de profagos y plásmidos	52
6.	DISCUSIÓN	53
7.	CONCLUSIONES	66
8.	RECOMENDACIONES	67
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
10.	ANEXOS.....	93

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales factores de virulencia, localización y funciones	15
Tabla 2. Características generales de algunos genomas de <i>S. Typhimurium</i>	31
Tabla 3. Herramientas de predicción de funciones utilizadas por Prokka	31
Tabla 4. Resumen de los factores de virulencia que presenta la VFDB.....	35
Tabla 5. Características generales del genoma de <i>Salmonella Typhimurium</i> VET1	46
Tabla 6. Lista de proteínas de resistencia identificadas por CARD.....	50
Tabla 7. Lista de profagos identificados por PHASTER.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Parálisis de los miembros posteriores en un cuy con salmonelosis	7
Figura 2. Hepatitis necrótica en un cuy positivo para <i>Salmonella</i> sp	8
Figura 3. Desglose de la nomenclatura del género <i>Salmonella</i>	11
Figura 4. Modelo de patogenia de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.....	14
Figura 5. Representación esquemática del repertorio y ubicación genómica relativa del <i>loci</i> fimbrial en el genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium LT2.....	16
Figura 6. Representación esquemática de los genes que se encuentran dentro de las cinco SPI y sus funciones putativas	19
Figura 7. Flujo de trabajo completo de secuenciación.....	24
Figura 8. Flujo de trabajo para la identificación de los factores de virulencia y resistencia a los antibióticos de patógenos bacterianos.....	27
Figura 9. Flujo de trabajo de laboratorio para la anotación y predicción de factores de virulencia del genoma de <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa VET1	40
Figura 10. Mapa del genoma circular de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	45
Figura 11. Visualización de la comparación de genomas y la identificación SPI1-3 y profagos.....	47
Figura 12. Porcentaje de factores de virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium VET1 obtenidos durante la búsqueda contra la base de datos de factores de virulencia (VFDB)	48

RESUMEN

El cuy (*Cavia porcellus*) es un roedor nativo de la región andina del Perú, el cual es la base de la economía y la dieta de la población rural. La principal enfermedad infecciosa que afecta a estos animales es la salmonelosis, causada por microorganismos del género *Salmonella*. Se han identificado más de 2 500 serotipos de *Salmonella enterica*, de los cuales, los serotipos Enteritidis y Typhimurium son los más comunes en cuyes domésticos, siendo este último el más predominante. Dado el potencial virulento de *S. Typhimurium* en cuyes, el objetivo principal de este estudio fue caracterizar la capacidad virulenta de una cepa aislada de la vesícula biliar de un cuy, con signos compatibles con salmonelosis, para identificar sus genes asociados a virulencia y resistencia a antibióticos. En este estudio, el genoma completo de *S. Typhimurium* cepa VET1 se sometió a un análisis *in silico*, que comenzó con el secuenciamiento mediante la plataforma Illumina HiSeq para generar lecturas de 2×101 pb. La calidad de los datos se verificó con FASTQC y los adaptadores fueron recortados con Trimmomatic. Las lecturas fueron ensambladas usando Velvet v.1.2.10 y se generaron 149 *contigs* con una cobertura de 111.0x, que dio como resultado un tamaño total del genoma de 4 905041 pb, con un contenido de G + C del 52.14%. La anotación génica mostró 4 885 genes, de los cuales 4 630 fueron CDS y 255 ARN, incluyendo 2 de ARNr, 56 ARNr y 197 ARNnc. Usando PHASTER, se identificaron tres regiones de profagos, incluyendo Gifsy-2, 118970_sal3 y RE-2010. La cepa VET1 fue asignada a ST19 utilizando el tipo de secuencia multilocus (MLST). Se identificó un total de 244 factores de virulencia. Entre ellos, 78 pertenecían a genes codificadores del sistema de secreción tipo 3 (T3SS), 68 a genes codificadores de la adherencia fimbrial y 51 a genes que codifican flagelos. Se consultó la base de datos CARD para identificar genotipos relacionados con la resistencia en el genoma de *S. Typhimurium* VET1. Se identificaron un total de 16 proteínas relacionadas a resistencia antimicrobiana, que pertenecen a 6 familias diferentes de

genes de resistencia a antibióticos. Este estudio mostró que la cepa VET1 alberga genes que codifican adhesinas, proteínas flagelares, T3SS, sistemas de adquisición de hierro y genes de resistencia a antibióticos que pueden explicar la patogenicidad, capacidad de colonización y persistencia en el cuy. La existencia de elementos genéticos móviles sugiere que esta cepa podría adquirir y transferir material genético. El análisis genómico comparativo entre VET1 y otras cepas de *Salmonella* proporcionaría información fructífera para comprender la especificidad del huésped y desarrollar medidas de control contra la infección por *S. Typhimurium*.

Palabras clave: *Salmonella Typhimurium*, cuy, análisis genómico, factores de virulencia, salmonelosis

ABSTRACT

The guinea pig (*Cavia porcellus*) is a rodent native to the Andean region of Peru, which is the basis of the economy and diet of the rural population. The main infectious disease that affects these animals is salmonellosis, caused by microorganisms of the genus *Salmonella*. More than 2500 serotypes of *Salmonella enterica* have been identified, of which serotypes Enteritidis and Typhimurium are the most common in domestic guinea pigs, the latter being the most predominant. Given the virulent potential of *S. Typhimurium* in guinea pigs, the main objective of this study was to characterize the virulent capacity of a strain isolated from the gallbladder of a guinea pig, with signs compatible with salmonellosis, to identify its genes associated with virulence and resistance to antibiotics. In this study, the complete genome of *S. Typhimurium* strain VET1 was subjected to an *in silico* analysis, which began with the sequencing using the Illumina HiSeq platform that generated reads of 2 × 101 bp. The quality of the data was verified with FASTQC and the adapters were trimmed with Trimmomatic. The reads were assembled using Velvet v.1.2.10 and 149 contigs with a coverage of 111.0x were generated, which resulted in a total genome size of 4 905 041 bp, with a G + C content of 52.14%. The gene annotation showed 4 885 genes, of which 4 630 were CDS and 255 RNA, including 2 rRNA, 56 rRNA and 197 mRNA. Using PHASTER, three profane regions were identified, including Gifsy-2, 118970_sal3 and RE-2010. Strain VET1 was assigned to ST19 using the multilocus sequence type (MLST). A total of 244 virulence factors were identified. Among them, 78 belonged to genes coding for the type 3 secretion system (T3SS), 68 genes coding for fimbrial adhesion and 51 genes coding for flagella. The CARD database was consulted to identify genotypes related to resistance in the genome of *S. Typhimurium* VET1. A total of 16 proteins related to antimicrobial resistance were identified, which are part of 6 different families of antibiotic resistance genes. This study showed that *Salmonella Typhimurium* harbors genes that encode adhesins, flagellar proteins, T3SS, iron acquisition systems

and resistance genes to antibiotics that can explain its pathogenicity, colonization capacity and persistence in the guinea pig. The existence of mobile genetic elements suggests that this strain could acquire and transfer genetic material. The comparative genomic analysis between strain VET1 and other strains would provide fruitful information to understand host specificity and develop control measures against *S. Typhimurium* infection.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, guinea pig, genomic analysis, virulence factors, salmonellosis

1. INTRODUCCIÓN

El cuy o cobayo (*Cavia porcellus*) es una especie nativa de los andes sudamericanos, el cual es la base de la alimentación y economía de las poblaciones rurales. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el Perú y su importancia ha aumentado significativamente debido a su bajo costo de producción (Chauca, 1997). Se estima que la población existente es de 12 695 030 cuyes (INEI, 2012), aunque según el Ministerio de Agricultura (MINAG) esta podría superar los 22 millones de cuyes en el país. En el Perú, los principales departamentos productores son: Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, La Libertad y Lima (INIA, 2003); considerándose el mayor país productor de Latinoamérica.

La importancia del cuy como especie radica en sus propiedades nutricionales y productivas. Su carne cumple con altos estándares nutricionales, su porcentaje de grasa es menor al 10%, posee alto porcentaje proteico (20.3%) y bajo contenido de colesterol (65mg/100g). Además, el cuy es un animal rústico, de ciclo de vida corto y fácil alimentación, su carne es apta para todos los grupos poblacionales (Gil, 2007).

El cuy es una especie susceptible de sufrir enfermedades bacterianas, virales y/o parasitarias, que afectan negativamente la producción en el criadero, ocasionando grandes pérdidas económicas. Pérdidas, que no sólo se muestran como causantes de mortalidades y morbilidades, sino que tienen consecuencias negativas en el desarrollo poblacional (Morales, 2017).

La salmonelosis es la enfermedad más importante que afecta a los cuyes en nuestro país (Matsuura *et al.*, 2010). Es una zoonosis de transmisión alimentaria, y es considerada una de las principales problemáticas en salud pública a nivel mundial (Antunes *et al.*, 2016). La enfermedad es causada por bacterias del género *Salmonella*, el cual comprende dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. A su vez, *S. enterica* se puede dividir en seis subespecies, de las cuales la subespecie *enterica* es

considerada como el principal agente etiológico de esta enfermedad (Fàbrega y Vila, 2013).

Se han identificado más de 2500 serotipos de *Salmonella enterica*, los cuales son capaces de causar infección en animales y humanos (Timme *et al.*, 2013). Los serotipos Enteritidis y Typhimurium son los más comunes en los cuyes domésticos (Fox *et al.*, 1984), los cuales, al establecerse en el criadero, se diseminan rápidamente, eliminando progresivamente a todos los miembros de este. Además, han sido reportados en casos recientes de zoonosis en humanos (Bartholomew *et al.*, 2014; Fournier *et al.*, 2015).

Siendo *Salmonella* Typhimurium uno de los principales agentes causantes de pérdida económica en la producción de cuyes, se hace necesario identificar los factores de virulencia asociados a su patogenicidad. Además, el uso extensivo de antibióticos, empleados para combatir la enfermedad, ha traído varias consecuencias, como el incremento de la resistencia bacteriana frente a algunos antibióticos de uso común (cloranfenicol, trimetoprim y sulfametoxazol) y últimamente a las fluoroquinolonas. Por lo que actualmente existen *Salmonella* multidroga resistentes (Mattos *et al.*, 2013).

Al mismo tiempo, una herramienta que resulta de gran utilidad es la secuenciación de genomas completos para obtener información sobre las características de una bacteria. Si esta es patógena, proporciona además información sobre sus mecanismos de patogenicidad, permitiendo identificar genes que podrían tener un papel importante en el desarrollo de la infección (Aguado, 2013).

Salmonella Typhimurium es un microorganismo conocido por ser patógeno de cuyes, y causante de infección en otras especies, como la humana. Además, es uno de los serotipos más estudiados en todo el mundo y cuenta con genomas bien caracterizados que se encuentran disponibles en las bases de datos (Okoro *et al.*, 2012).

En tal sentido, el presente trabajo tiene como objetivo identificar los genes asociados a virulencia de *Salmonella* Typhimurium causante de enfermedad (salmonelosis) en cuyes, mediante el análisis de su genoma. Asimismo, se identificarán genes de resistencia a antibióticos que puedan contribuir a aumentar su patogenicidad, así como profagos que se encuentren latentes en el genoma. Para esto, se decidió utilizar la tecnología Illumina™ para el secuenciamiento del genoma completo de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de cuy con signos clínicos compatibles con salmonelosis. El estudio de este genoma podrá conducir al descubrimiento de nuevos determinantes de virulencia que puedan utilizarse como candidatos en el desarrollo de nuevas estrategias tanto para la prevención como para el tratamiento de salmonelosis en cuyes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Salmonelosis en cuyes

2.1.1 Generalidades

La salmonelosis es una enfermedad mundial causada por bacterias del género *Salmonella* (Freitas *et al.*, 2010) y es considerada como la enfermedad más importante que afecta a los cuyes en nuestro país (Matsuura *et al.*, 2010).

Durante largo tiempo se ha observado la gran susceptibilidad que tienen los cuyes a esta enfermedad, sin embargo aún son escasos los reportes con datos exactos que permitan tener una idea clara de la realidad de la salmonelosis en estos animales (Matsuura *et al.*, 2010). Se sabe que genera un impacto económico negativo en la producción de cuyes, por los altos índices de mortalidad y por el conjunto de patologías orgánicas y sistémicas que produce (Cano, 2012).

La salmonelosis en animales de producción, como el cuy, juega un importante papel en la salud pública y particularmente en la seguridad alimentaria, debido a que los productos de origen animal son considerados como la mayor fuente de contagio para infecciones por *Salmonella* (OIE, 2010). Uno de los primeros reportes sobre casos de salmonelosis en nuestro país es el descrito por Ameghino (1968), acerca de un brote con alrededor de 95% de mortalidad, en una granja en Huancayo. Posteriormente, Ramírez (1972), realizó un estudio bacteriológico de un brote infeccioso en cuyes en una granja de la localidad de Barranca, encontrando a microorganismos del género *Salmonella* en un 65.5% de los animales estudiados. Asimismo, en un estudio realizado en la provincia de Áncash, Matsuura *et al.* (2010) halló una prevalencia de 61.5% de *Salmonella enterica*.

Algunos factores que predisponen a la infección en cuyes específicamente, incluyen la edad (gazapos o adultos), el estrés (preñez, destete, movimiento de animales, etc), deficiencias nutricionales, genética, serotipo infectante, medio ambiente (iluminación, ventilación, etc), variaciones de temperatura y humedad (Canchari, 1995).

2.1.2 Agente etiológico

Las enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso generalmente surgen al ingerir alimentos o agua contaminados y pueden tener una gran cantidad de agentes etiológicos, conocidos como patógenos entéricos. Entre ellos, el género *Salmonella* es de particular relevancia clínica tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo, donde representa una de las causas más comunes de enfermedades transmitidas por los alimentos y es una causa importante de enfermedades diarreicas, respectivamente (Kariuki *et al.*, 2006; Kozak *et al.*, 2013).

La salmonelosis es causada por bacterias del género *Salmonella*. Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está constituido por bacterias gramnegativas, intracelulares facultativas (CDC, 2013). Estos microorganismos se han convertido en una pesada carga para la salud pública en Perú y otros países del mundo, y existen más de 2500 serotipos de *Salmonella* diferentes que se han identificado hasta el momento (Malorny *et al.*, 2011).

Debido a que la salmonelosis se transmite a través de alimentos contaminados y carnes poco cocidas, los reservorios más comunes son animales como pollos, cerdos, pavos y vacas (Pui *et al.*, 2011). Las fuentes ambientales también pueden presentar la bacteria *Salmonella*. Cuando *Salmonella* coloniza el tracto gastrointestinal, los microorganismos se excretan en las heces, los cuales pueden ser transmitidos por insectos y otros animales a una gran cantidad de lugares y generalmente se encuentran en el agua contaminada (Gillespie *et al.*, 2005). *Salmonella* no se originan en el agua; por lo tanto su presencia denota contaminación fecal (Abulreesh, 2012). Los humanos y los animales que consumen agua contaminada pueden eliminar los microorganismos a través de la materia fecal y así continuar con el ciclo de contaminación. Por lo tanto, los humanos infectados también pueden actuar como reservorios y transmitir la salmonelosis de un humano a otro.

La salmonelosis afecta de forma universal a la mayoría de las especies, generando de esta manera problemas en explotaciones pecuarias y en salud pública. En los cuyes, esta enfermedad origina altos porcentajes de morbilidad y mortalidad, que sumado al escaso conocimiento en tratamiento y prevención, hacen del productor de cuyes blanco fácil de esta enfermedad (Ramírez, 1976; Radostits, 2002).

2.1.3 Signos clínicos

Los signos clínicos de salmonelosis en cuyes incluyen anorexia, cambio de pelaje, abdomen inflamado, diarrea, abortos, infertilidad, parálisis de las extremidades posteriores (Figura 1) y caquexia. La salmonelosis también se puede presentar de forma aguda, esto se caracteriza por un cuadro septicémico (Orson, 1972), muriendo los animales en un lapso de 24 a 48 horas por muerte hiperaguda, depresión grave, deterioro rápido, letargo y disnea (Ramírez, 1972). En los casos crónicos, es notorio un adelgazamiento paulatino, pelaje deslucido, aumento del volumen del vientre debido a ascitis (Simeone y Aramburu, 1967; Chauca, 1997). De ambas formas de manifestación, el cuadro agudo es el que más mortalidad causa (Evans, 2014).

Los cuadros crónicos son los casos más comunes y su presentación indica que *Salmonella* se encuentra establecida en la granja. El tipo de presentación dependerá del serotipo y cepa de la *Salmonella*; sin embargo, el cuy también presenta un estado de infección latente en el cual no presenta manifestaciones clínicas de ello hasta que sea sometido a situaciones de estrés (Ganaway, 1976).



Figura 1. Parálisis de los miembros posteriores en un cuy con salmonelosis (Tomado de Layme, 2010)

Salmonella se puede aislar de hígado, de bazo, los intestinos, los pulmones y el útero en cuyes (aumento de tamaño, congestión, abscesos y necrosis focal); (Matsuura et al., 2010). Los hallazgos patológicos son más comunes en los mismos órganos, siendo el hígado el más afectado (Figura 2), seguido por el intestino. La inflamación (en su mayoría catarrales, pero también hemorrágicas y necróticas) es el tipo más común de lesión, pero también son comunes los trastornos circulatorios como la petequias, el edema (que se encuentra en la cavidad abdominal y el saco pericárdico) y el enfisema (en los pulmones). Estos cambios son característicos de la septicemia. Los cuyes infectados tienen en promedio cinco órganos afectados (Layme, 2010, Iijima et al., 1987, Pivnick et al., 1966). Según Iijima et al. (1987) una lesión común en cuyes con salmonelosis es el agrandamiento de ganglios linfáticos cervicales, que ocasionalmente contienen pus. En el tracto reproductivo puede haber focos necróticos en el miometrio y abortos (Parra et al., 2002)

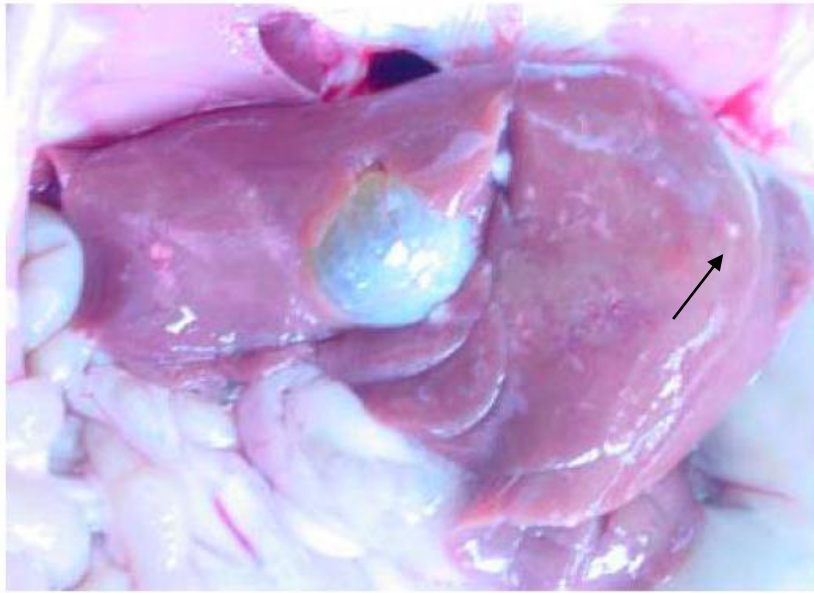


Figura 2. Hepatitis necrótica en un cuy positivo para *Salmonella* sp. Se observan los focos necróticos en la superficie del hígado (flecha) y también la dilatación de la vesícula biliar. (Tomado de Layme, 2010)

Cabe destacar que la infección por *Salmonella* no es una causa suficiente para contraer una salmonelosis clínica, a excepción de los animales recién nacidos, es por ello que debemos considerar distintos factores, del hospedero, del agente o del entorno, los cuales desencadenan la enfermedad en animales infectados (Stellmacher, 1981; Quinn *et al.*, 2002; Radostits *et al.*, 2002).

Finalmente, la edad es claramente una susceptibilidad a la enfermedad clínica y también algo a la infección. Por ende, es importante considerar que lo animales jóvenes desarrollan infecciones más severas, por lo que la muerte súbita puede ocurrir con o sin signos clínicos previos. Esto se explica parcialmente por su incapacidad de obtener anticuerpos específicos del calostro; no hay ninguna explicación razonable de por qué los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos (Jubb *et al.*, 1990).

2.2 *Salmonella* Typhimurium

2.2.1 Características generales

Actualmente se reconocen dos especies en el género *Salmonella*, *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall *et al.*, 2005). *S. enterica* se puede subdividir en 6 subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, y *S. enterica* subsp. *indica* según sus modificaciones bioquímicas y genómicas (Brenner *et al.*, 2000). Son bacilos gram-negativos, productores de sulfuro de hidrógeno, oxidasa negativa y catalasa positiva. Otras propiedades bioquímicas que permiten la identificación de *Salmonella* incluyen la capacidad de crecer en citrato como única fuente de carbono, descarboxilar lisina e hidrolizar urea (Jensen *et al.*, 2000; Abulreesh, 2012).

Probablemente el serovar de *Salmonella* mejor estudiado es *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*). *Salmonella* Typhimurium es un patógeno entérico primario que infecta a humanos y animales. La infección comienza con la ingestión de alimentos o agua contaminados para que *Salmonella* alcance el epitelio intestinal y desencadenen enfermedades gastrointestinales (Fàbrega y Vila, 2013).

En Perú, el serovar que se ha aislado con mayor frecuencia de órganos de cuyes muertos debido a la salmonelosis, es el serovar Typhimurium, en frecuencias que superan el 95% en relación a otros serovares. Ameghino (1968) describió uno de los primeros reportes acerca de un brote de salmonelosis con alrededor de 95% de mortalidad, en una granja en Huancayo, logrando aislar *Salmonella* a partir de pulmones, hígado e intestinos que luego se identificaron como *S. Typhimurium*. Posteriormente, en un estudio realizado en la provincia de Carhuáz, Áncash, se halló una prevalencia de 61.5% de *Salmonella* Typhimurium (Matsuura *et al.*, 2010), mientras que Guamán (2014) reportó un 34% de presencia de este agente en el sistema de crianza comercial. Morales (2012) aisló *Salmonella* Typhimurium en un

16.7% del total de cepas obtenidas por hisopados rectales de cuyos reproductores machos mejorados destinados a ser introducidos al distrito de San Marcos (crianza familiar- comercial).

2.2.2 Clasificación y nomenclatura

Salmonella fue descubierta por primera vez y aislada de los intestinos de cerdos infectados con peste porcina clásica, por Theobald Smith en 1855. Sin embargo, la cepa bacteriana fue nombrada en honor al Dr. Daniel Elmer Salmon, un patólogo estadounidense que trabajó con Smith. La nomenclatura de *Salmonella* es controvertida y sigue evolucionando. Actualmente, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) utilizan el sistema de nomenclatura de *Salmonella* recomendado por el Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Popoff *et al.*, 2003).

De acuerdo con este sistema, el género *Salmonella* se clasifica en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, según las diferencias en su análisis de secuencia de 16S ARNr. *S. enterica*, puede clasificarse en seis subespecies (Figura 3) según su relación genómica y sus propiedades bioquímicas (Reeves *et al.*, 1989). Además, estos resultados fueron similares en estudios posteriores de ADN mediante técnicas de hibridación (Caffer y Terragno, 2001).

Las subespecies se indican con números romanos: I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizona*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizona*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae* y VI, *S. enterica* subsp. *indica*. Entre todas las subespecies de *Salmonella* (Figura 3), *S. enterica* subsp. *enterica* (I) se encuentra predominantemente en mamíferos y contribuye con aproximadamente el 99% de las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales de sangre caliente. En contraste, las otras cinco subespecies de *Salmonella* y *S. bongori* se encuentran principalmente

en el medio ambiente y también en animales de sangre fría y, por lo tanto, son raras en los humanos (Brenner *et al.*, 2000).

Existen más de 2500 serotipos identificados en el género *Salmonella*, en la Figura 3 se muestra el número de serotipos identificados hasta el momento dentro de cada especie y subespecie, así como sus principales hábitats.

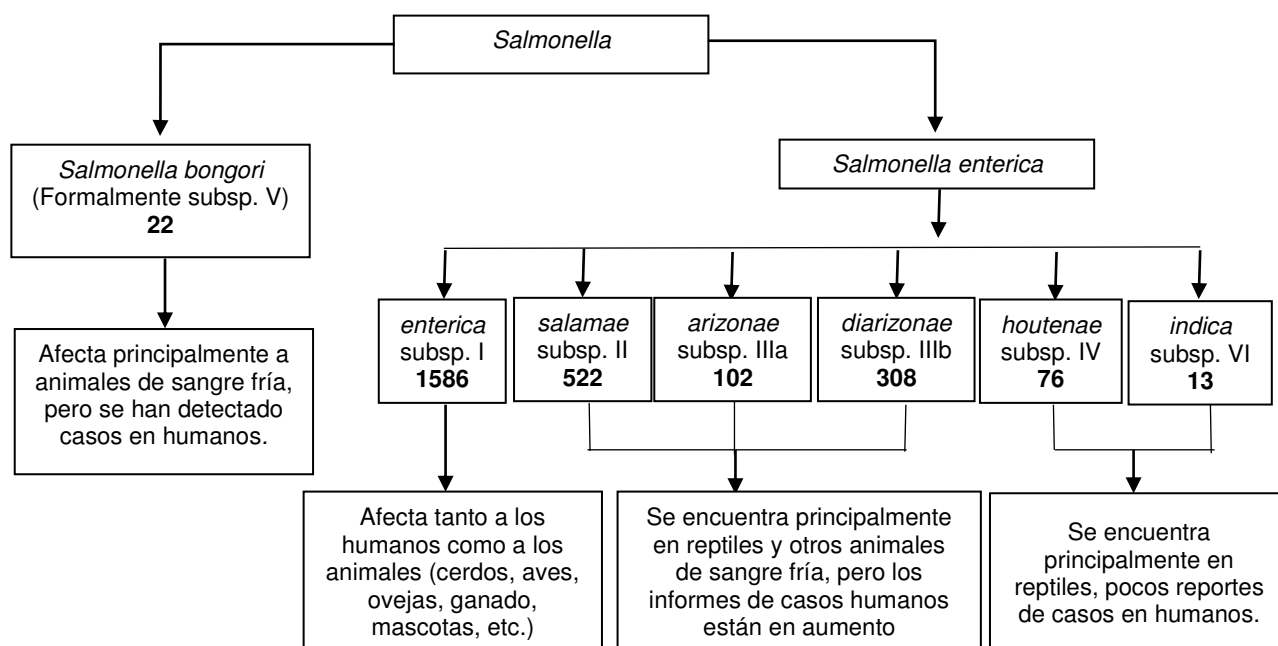


Figura 3. Desglose de la nomenclatura del género *Salmonella* (Modificado de CDC, 2016)

Este método de clasificación es también denominado como “Esquema de Kauffman-White”, el cual clasifica la *Salmonella* por serotipo basándose en tres determinantes antigénicos principales: somático (O), capsular (K) y flagelar (H) (Brenner *et al.* 2000). El serotipado es un procedimiento serológico que separa cepas de microorganismos en diferentes grupos según su composición antigénica (Nataro *et al.*, 2011). En este caso, el antígeno O determina el grupo al que pertenece el aislado de *Salmonella*, mientras que el antígeno H determina el serovar (Agasan *et al.*, 2002). *Salmonella* es agrupada en seis serogrupos para los antígenos O somáticos, designados A, B, C1, C2, D y E. Este sistema de agrupamiento proporciona información valiosa para

estudios epidemiológicos y permite la identificación del género de infecciones por *Salmonella* (Wattiau *et al.* 2011).

En la práctica clínica los nombres de las subespecies no necesitan ser indicados debido a que solo los serovares de la subespecie *enterica* poseen un nombre. El género *Salmonella* seguido del nombre del serotipo deben ser usados para la práctica de rutina (Ejem: *Salmonella* Typhimurium en vez de *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium). Los serovares de las otras subespecies son designados por una formula antigénica, incluyendo la subespecie designada por números romanos (Ejem: *Salmonella* IV 48:g.z51) (OIE, 2010).

2.2.3 Patogénesis

La infección por *Salmonella* Typhimurium comienza con la ingestión de organismos en alimentos o agua contaminados. Como tales, los microorganismos se enfrentan a una impresionante variedad de defensas no específicas del huésped, como el ambiente ácido del estómago, el moco intestinal y la microbiota intestinal normal (Uzzau *et al.*, 2000).

Después de ingresar al intestino delgado, *Salmonella* debe alcanzar y atravesar la capa de moco intestinal antes de encontrar y adherirse a las células epiteliales intestinales. En ratones, parece que *Salmonella* se adhiere y entra preferentemente en las células M de las placas de Peyer (PP) en el epitelio intestinal, aunque también puede producirse la invasión de enterocitos normalmente no fagocíticos (Fàbrega y Vila, 2013). Las células M constituyen una puerta de entrada ideal para las enterobacterias debido a la ausencia del borde en cepillo así como de glucocálix (Figura 4). Para esto, la bacteria cuenta con estructuras llamadas adhesinas, las cuales permiten reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, estos receptores determinan la especificidad del tejido así como la colonización y persistencia bacteriana. De esta manera, esta unión adhesina-

receptor determinan los hospederos y el organotropismo de la bacteria (Figuroa y Verdugo, 2005).

Poco después de la adhesión, el proceso de invasión aparece como consecuencia de las vías de señalización de las células hospedadoras comprometidas que conducen a reordenamientos citoesqueléticos profundos (Francis *et al.*, 1992). Estas modificaciones internas rompen el borde del cepillo epitelial normal e inducen la formación subsiguiente del ondulamiento de membrana (*ruffling*) que envuelve bacterias. Después del engullimiento de *Salmonella* en la célula huésped, la bacteria se encuentra dentro de una vesícula de membrana llamado vacuola que contiene *Salmonella* (SCV), que está compuesta por la membrana de la célula huésped (Figura 4). En circunstancias normales, la presencia del cuerpo extraño bacteriano activaría la respuesta inmune de la célula huésped, lo que resultaría en la fusión de los lisosomas y la secreción de enzimas digestivas para degradar las bacterias intracelulares. Sin embargo, *Salmonella* utiliza el sistema de secreción tipo III para inyectar otras proteínas efectoras en la vacuola, lo que provoca la alteración de la estructura del compartimento. La vacuola remodelada bloquea la fusión de los lisosomas y esto permite la supervivencia intracelular y la replicación de las bacterias dentro de las células huésped (Monak *et al.*, 2004).

A partir de ese momento, una fracción de estos SCV realiza transcitosis a la membrana basolateral. Una vez que cruzan el epitelio intestinal, *Salmonella* es engullida por fagocitos. La migración de estos fagocitos infectados, predominantemente macrófagos, facilita la diseminación sistémica de las bacterias a través del torrente sanguíneo a varios tejidos adicionales, como el bazo y el hígado, donde este patógeno se replica preferentemente (Ohl *et al.*, 2001).

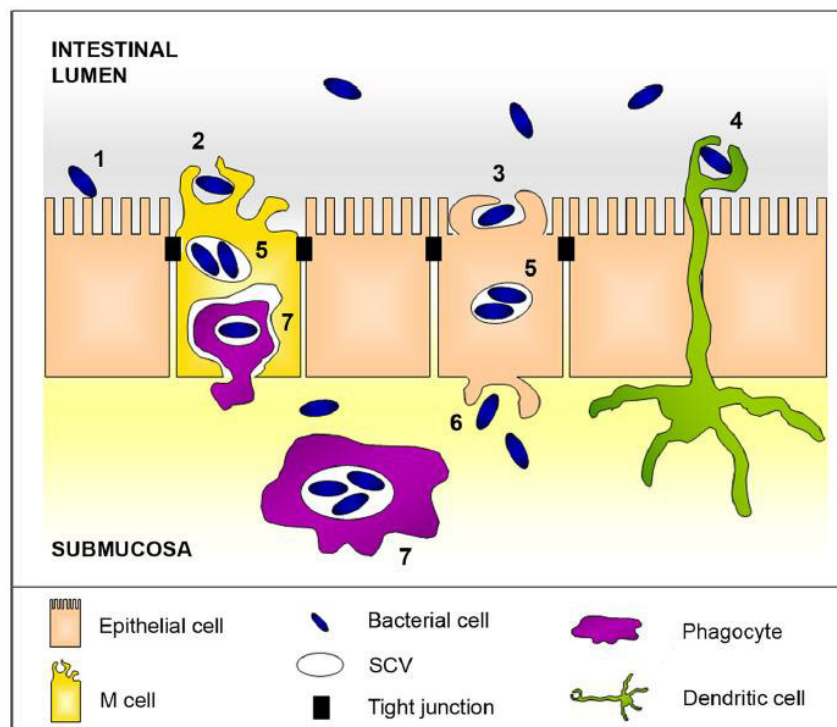


Figura 4. Modelo de patogenicidad de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. 1: *Salmonella* se adhiere al epitelio intestinal mediante adhesinas. 2 y 3: sigue la invasión de bacterias, y la absorción que es mediada por factores de virulencia. 4: Alternativamente, las células bacterianas también pueden ser captadas directamente por las células dendríticas de la submucosa. 5: una vez dentro del citoplasma, la *Salmonella* se localiza dentro del SCV, donde se replica. 6: los SCV transitan en la membrana basolateral y liberan las células internas a la submucosa. 7: las bacterias se internalizan dentro de los fagocitos y se ubican nuevamente dentro de un SCV. Por último, estos fagocitos infectados pueden diseminarse a través de la linfa y el torrente sanguíneo. (Tomado de Fàbrega y Vila, 2013).

Las infecciones intestinales por *Salmonella* pueden evolucionar hacia infecciones extraintestinales, esto se relaciona con la incapacidad de los macrófagos de destruir a las bacterias ingeridas. *Salmonella enterica* se dispersa por el organismo, probablemente transportadas por fagocitos, inicialmente por vía linfática y después por vía sanguínea originando así una bacteriemia que puede ser sintomática, con riesgo elevado de evolucionar a septicemia (Jubb *et al.*, 1990; Benenson *et al.*, 2002).

La septicemia puede transcurrir como infección no localizada, que se manifiesta con fiebre, cuyos síntomas pueden persistir varias semanas e incluso degenerar en shock séptico, debido a la actuación de la endotoxina a nivel del sistema circulatorio.

Además, al diseminarse por el organismo, la bacteria puede llegar a colonizar diversos órganos, provocando infecciones locales (Jubb *et al.*, 1990; Benenson *et al.*, 2002)

2.2.4 Factores de virulencia

Para superar el proceso patogénico de adherencia bacteriana, invasión, maduración y replicación de SCV descrito anteriormente, *S. Typhimurium* posee muchas estrategias de virulencia empleadas para interactuar con los mecanismos de defensa del huésped. La mayoría de los genes que codifican los factores de virulencia más importantes se encuentran en las denominadas Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI), mientras que otros se encuentran en un plásmido de virulencia (pSLT). Hasta ahora, se ha identificado un total de cinco SPI (SPI-1 a SPI-5) que están claramente implicadas en la virulencia de *S. Typhimurium*, junto con otros componentes de virulencia tales como varios tipos de fimbrias, flagelo y lipopolisacáridos (Marcus *et al.*, 2000; Coburn *et al.*, 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales factores de virulencia, localización y funciones (Modificado de Dos Santos *et al.*, 2018)

Factor virulento	Localización	Función
SipA	SPI-1	Reorganización del citoesqueleto
SipB	SPI-1	Translocación de proteínas efectoras
SipC	SPI-1	Quimiotaxis
Genes <i>trr</i>	SPI-2	Producción de tetrionato reductasa
SpiC	SPI-2	Supervivencia dentro del SCV
SseB, SseC, SseD	SPI-2	Formación de estructuras macromoleculares
SseF	SPI-2	Migración perinuclear SCV
MisL	SPI-3	Persistencia a largo plazo
MgtCB	SPI-3	Supervivencia dentro de macrófagos
SiiE	SPI-4	Adhesión al epitelio
SopB	SPI-5	Previene apoptosis de células epiteliales
SigE	SPI-5	Chaperona
Fimbria tipo I	Cromosoma	Adhesión al epitelio
SopE	Cromosoma	Induce ondulamiento de membrana (<i>ruffling</i>)

2.2.4.1 Factores de colonización (fimbrias y adhesinas)

Las fimbrias son estructuras que se encuentran en la superficie celular de algunas bacterias, y se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la formación de biopelículas, la colonización y el ataque inicial de la bacteria en el huésped (Jong *et al.*, 2012). Con la publicación de la secuencia del genoma de *S. Typhimurium* LT2, se reveló la existencia de 13 *loci* fimbriales predichos: *agf (csg)*, *fim*, *lpf*, *pef*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, *sth*, *sti*, *saf*, y *stj* (McClelland *et al.*, 2001) (Figura 5). Desde entonces, se han realizado varios estudios para determinar su acción en la virulencia de este patógeno. A pesar de que varios operones fimbriales han sido reportados dentro del genoma de *S. Typhimurium*, no hay información disponible sobre la especificidad de unión de sus productos en todos los casos. Solo los operones fimbriales *fim* (Tipo I), *agf* (agregativas delgadas o *curli*), *lpf* (polares largas) y *pef* (codificadas por plásmidos) poseen información sobre la interacción de estas con las células del hospedero (Fàbrega y Vila, 2013). Es importante resaltar que no todas las fimbrias están asociadas exclusivamente con virulencia, ya que las cepas no patógenas pueden contener uno o más de los operones fimbriales conocidos.

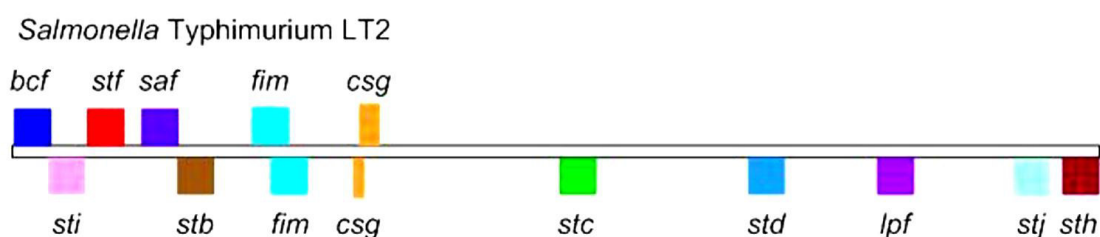


Figura 5. Representación esquemática del repertorio y ubicación genómica relativa del *locus* fimbrial en el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2. Cada caja coloreada representa un *locus* fimbrial distinto codificado en la orientación de sentido (superior) o antisentido (inferior). No es a escala. (Tomado de Clayton *et al.*, 2008)

Estudios preliminares realizados por Bäumlér *et al.* (1996) usaron un enfoque genético para investigar el papel de tres operones fimbriales (*fim*, *lpf* y *pef*) en la

adhesión de *Salmonella* Typhimurium a diferentes líneas celulares epiteliales (HEp-2 y HeLa). Los resultados mostraron una disminución significativa en la adhesión a células HEp-2 solo para los mutantes de *lpf*, mientras que la eliminación total disminuyó significativamente la adhesión de *Salmonella* Typhimurium a HeLa. Estos resultados sugirieron que el repertorio bacteriano de adhesinas fimbriales determina a qué tipo de célula epitelial se adherirá la bacteria durante la infección (Bäumler *et al.*, 1996).

También existen otras proteínas con propiedades adhesivas, como las adhesinas grandes (SiiE y BapA) o las proteínas autotransportadoras (por ejemplo, MisL), que participan en el proceso de adhesión (Blanc-Potard *et al.*, 1999)

2.2.4.2 Islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI)

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI) son regiones cromosómicas que llevan genes de virulencia que actúan como una unidad genética compacta y distinta conocida como operón (Marcus *et al.*, 2000). Estas regiones muestran una composición diferente del resto del cromosoma, con un mayor porcentaje de G + C (guanina y citosina) en comparación con las otras partes del ADN e incluso emplean un uso de codón diferente (Nieto *et al.*, 2016). Este hecho apoya la idea de la adquisición de SPI a través de la transferencia horizontal de genes.

Hasta la fecha, se han descrito cinco SPI en *Salmonella* Typhimurium, siendo SPI-1 y SPI-2 las más reconocidas y estudiadas (Eng *et al.*, 2015). Aunque las otras tres SPI no se han estudiado tan minuciosamente como las dos primeras, los estudios han informado sobre la participación de estas islas en la invasión y la supervivencia de *Salmonella* dentro de las células huésped (Fàbrega y Vila, 2013).

SPI-1 es la isla mejor caracterizada entre las cinco SPI. Se sabe que los genes codificados por esta región son esenciales en la etapa de invasión a través del epitelio intestinal (Marcus *et al.*, 2000). Eso fue comprobado por Galán y Curtiss (1989),

cuando atenuaron la invasión sistémica de *S. Typhimurium* al inocular por vía oral cepas mutantes de SPI-1 en ratas. Sin embargo, esto no ocurrió cuando la inoculación se realizó por vía parenteral. Lo que pone en evidencia que los genes de SPI-1 están estrechamente relacionados con la internalización de la bacteria por parte del huésped y son cruciales para que la bacteria penetre en la pared intestinal y consolide la invasión.

Entre las principales proteínas efectoras codificadas por SPI-1 se encuentran SipABCD, estructura que se incrusta en la membrana de la célula huésped y entrega los efectores al citosol (Collazo y Galán, 1997), y SptP, una fosfotirosina fosfatasa que altera el citoesqueleto de actina (Fu y Galán, 1998). Estos efectores se trasladan a la célula huésped por medio de un sistema de secreción de tipo III (T3SS), denominado T3SS-1, también codificado dentro de SPI-1 (Figura 6). Además, varias chaperonas también están codificadas dentro de SPI-1. Estas protegen las proteínas relacionadas con SPI-1 de la degradación, a través de la unión específica a sus dianas (proteínas secretadas o efectoras), evitando interacciones prematuras y/o mediando su reconocimiento por T3SS-1 (Ellermeier *et al.*, 2007).

SPI-2 es una isla de patogenicidad que está asociada con el mantenimiento de su permanencia en la célula huésped. Esta secuencia cromosómica consta de alrededor de 40 genes (Marcus *et al.*, 2000). SPI-2 está dividida en dos segmentos: uno grande y otro pequeño. Este último contiene los genes *trr*, que están involucrados en la producción de tetraciónato reductasa (Hensel *et al.*, 1999), y siete marcos de lectura abiertos (ORF), que hasta la fecha no han demostrado un papel significativo en la virulencia de *Salmonella Typhimurium* (Fàbrega y Vila, 2013).

Los mecanismos relacionados con SPI-2 son provocados por la acción de las proteínas efectoras inyectadas en el citoplasma del huésped por medio de su propio T3SS, T3SS-2, que también codifica su propia maquinaria de translocón (SseBCD).

En términos generales, SPI-2 alberga cuatro tipos de genes que son importantes para la virulencia: *ssa*, los genes que codifican el aparato T3SS-2; *ssr*, que codifica los reguladores; *ssc*, que codifica las chaperonas; y *sse*, que codifica las proteínas efectoras (Kuhle y Hensel, 2004) (Figura 6).

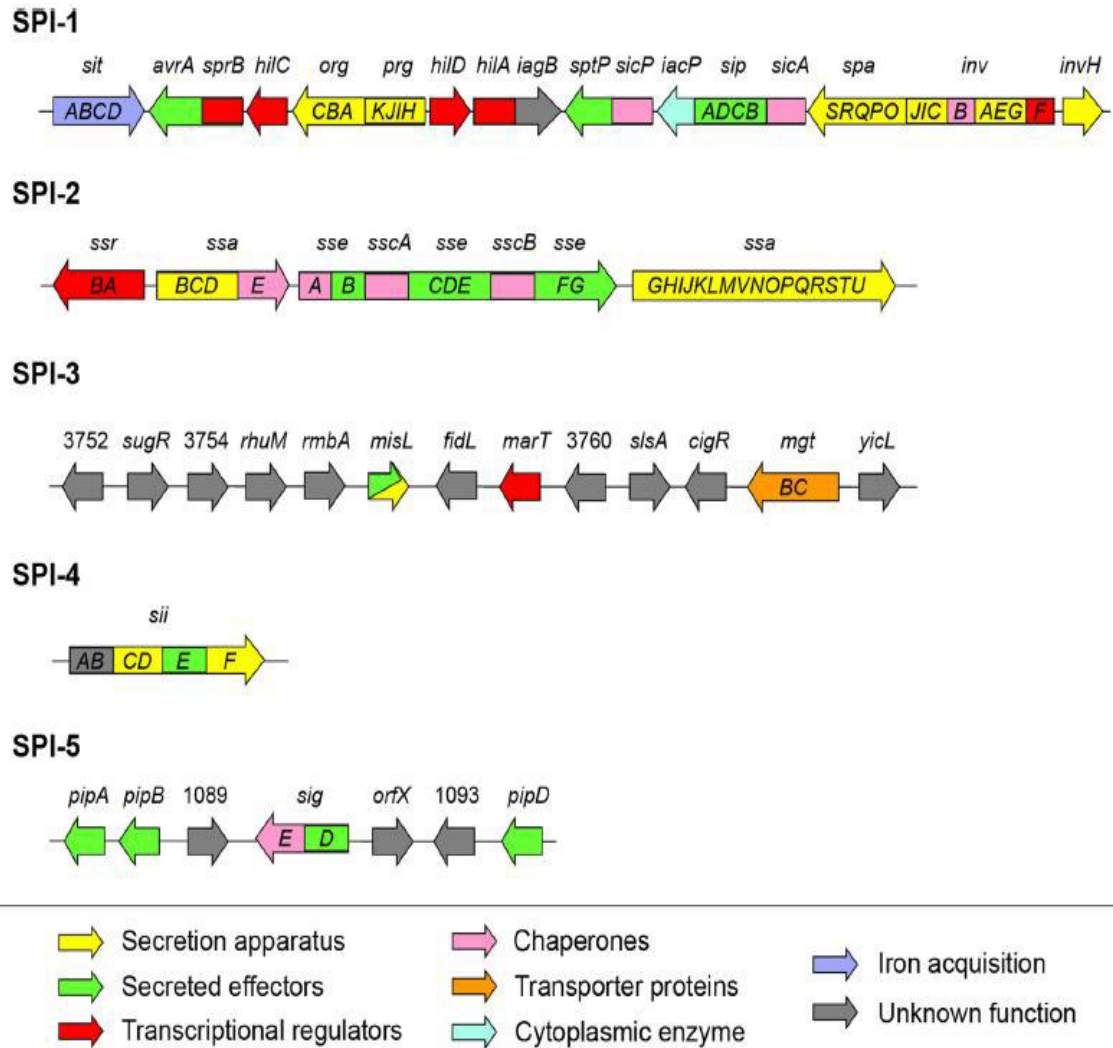


Figura 6. Representación esquemática de los genes que se encuentran dentro de las cinco SPI y sus funciones putativas (Tomado de Fàbrega y Vila, 2013).

Las tres SPI restantes no se han estudiado con tanto detalle como SPI-1 y SPI-2, y por lo tanto, existe menos información disponible sobre su función. SPI-3, por ejemplo, contiene sólo cuatro ORF que codifican proteínas con una función conocida.

Sin embargo, estas proteínas desempeñan papeles sin una relación evidente entre sí, ya que están involucradas tanto en la adhesión inicial como en la persistencia a largo plazo (MisL), así como en la supervivencia durante la diseminación sistémica (MgtCB) (Blanc-Potard *et al.*, 1999) (Figura 6).

SPI-4 contiene solo seis ORF, dispuestos en un solo operón denominado *siiABCDEF* (Fàbrega y Vila, 2013) (Figura 6). Sin embargo, su función aún no está del todo delimitada, ya que algunos genes juegan un papel durante la interacción inicial con el epitelio intestinal y otros posiblemente contribuyen a la persistencia a largo plazo de la bacteria (Gerlach *et al.*, 2007). Con el fin de descubrir el papel individual de cada gen codificado por el operón *sii*, Kiss *et al.* (2007) probaron la virulencia de mutantes portadores de deleciones no polares en genes *sii* individuales con cepas salvajes de *Salmonella*. Los resultados demostraron que, incluso a diferentes niveles, las cepas salvajes eran más virulentas que las seis mutantes *sii*, lo que sugiere que todas muestran cierta importancia en la virulencia de *Salmonella*. Sin embargo, se deben realizar más estudios para averiguar el papel exacto de estos genes en la patogenicidad de *Salmonella* Typhimurium.

Por último, SPI-5 participa en la realización de varios procesos patógenos durante la infección (Wood *et al.*, 1998) y está compuesta por cinco genes (*pipD*, *sigD/sopB*, *sigE/pipC*, *pipB* y *pipA*) (Knodler *et al.*, 2002). Wood *et al.* (1998) llevó a cabo estudios mutacionales para descubrir el papel de los genes *pipA*, *pipB* y *pipD*. Ninguno de los mutantes en estos genes tuvo su tasa de crecimiento o capacidad para invadir las células HeLa afectadas. Sin embargo, tanto las respuestas inflamatorias como la tasa de secreción de fluidos se redujeron en los mutantes de *pip* en comparación con las cepas salvajes. Esto sugiere que estos genes están directamente relacionados con la enteropatogenicidad de *Salmonella*, aunque no tienen un efecto en el desarrollo de la

invasión sistémica. Sin embargo, al igual que con SPI-4, se requiere más información para comprender específicamente las funciones de las proteínas codificadas.

2.2.4.3 Lipopolisacáridos (LPS)

El LPS es un componente de la pared celular de bacterias gram negativas que contiene patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En *S. Typhimurium*, el LPS se compone de tres dominios principales: un lípido A hidrófobo, un oligosacárido de núcleo no repetitivo corto y un polisacárido distal denominado antígeno O (O-ag). El O-ag consiste en la repetición de cadenas de polisacáridos de galactosa, ramnosa y manosa (Raetz y Whitfield, 2002). De acuerdo con el número de subunidades repetitivas vinculadas al núcleo del lípido A, el antígeno O se puede clasificar como corto o región S (11 a 17 monosacáridos); una región larga o L (16 a 35 subunidades), y muy larga o VL (35 a 100 o más subunidades). La longitud del polímero es responsable de las diferentes respuestas de interacción del huésped (Holzer *et al.* 2009). Los genes que codifican las enzimas para sintetizar el oligosacárido central y el polisacárido antígeno O se agrupan en dos operones conocidos como *waa* o *wba* (Friedrich y Whitfield, 2005).

Asimismo, se considera que el LPS actúa para proteger a la bacteria contra los mecanismos de defensa del huésped, como la acidez gástrica, las sales biliares y la actividad bactericida del complemento y los fagocitos (Morgan *et al.*, 2004). Sin embargo, claramente, la membrana externa bacteriana representa una plataforma para muchas estructuras de superficie involucradas en la virulencia. En un estudio reciente, una cepa con una mutación en *waaN*, que se requiere para la biosíntesis del dominio del lípido A de LPS, se atenuó luego de la infección intravenosa de ratones (Khan *et al.*, 1998) y también indujo una reducción de la invasión *in vitro* y respuestas enteropatógenas en comparación con la cepa salvaje (Watson *et al.*, 2000). Otro estudio realizado por Morgan *et al.* (2004) mostró que los mutantes LPS de *S.*

Typhimurium (*rfaK*, *rfaB*, *rfaG*, *rfaP*, *rfaN*, *rfaU*, *rfaH* y *rfaA*) no pudieron colonizar los intestinos de terneros, lo que sugiere un papel de los polisacáridos de superficie y las proteínas de la envoltura celular como factores de virulencia que contribuyen a la colonización de terneros por *S. Typhimurium*.

El papel preciso que tiene el LPS en la patogenicidad requiere una cuidadosa consideración, pero claramente tiene una influencia importante en la colonización realizada por *Salmonella*.

2.2.4.4 Flagelo

Los flagelos son apéndices superficiales de *S. Typhimurium* que se requieren no solo para la motilidad y la quimiotaxis, sino también para varios otros procesos en la patogénesis. La síntesis y función del sistema flagelar y de quimiotaxis requiere la expresión de más de 50 genes que se agrupan entre al menos 17 operones (*flh*, *flg*, *fli*, *flj*, *mot*, *che*, *tar*, *tsr* y *aer*) que constituyen el gran y coordinado regulón flagelar (Chilcott y Hughes, 2000).

De acuerdo con la transcripción jerárquica observada, los genes flagelares se dividen en temprano, medio y tardío, y los promotores correspondientes se denominan clase 1, clase 2 o clase 3, respectivamente (Chilcott y Hughes, 2000). La expresión de estos genes flagelares ocurre en la fase de crecimiento exponencial temprana, ya que juegan el papel más inicial en la patogénesis, permitiendo que las células de *Salmonella* alcancen el epitelio intestinal para una interacción adecuada (Saini *et al.*, 2010). Esto fue demostrado por Schmitt *et al.* (2001), donde los mutantes de *S. Typhimurium* carentes de flagelo pudieron adherirse a las células epiteliales intestinales cultivadas, sin embargo estas fueron defectuosas al invadir.

2.3 Genómica

2.3.1 Secuenciamiento Illumina HiSeq™ 4000

La tecnología Illumina® produce la familia de plataformas más utilizada. Esta se introdujo en 2006 y fue aceptada rápidamente por muchos investigadores debido a que se podría generar una mayor cantidad de datos de una manera más rentable (Fedurco *et al.*, 2006).

El flujo de trabajo de secuenciación de Illumina® se basa en tres pasos (Figura 7): (I) Se empieza con la preparación de las librerías de ADN que utiliza prácticamente cualquier muestra de ácido nucleico e implica la fragmentación aleatoria de la muestra junto con la ligación de los adaptadores (Fedurco *et al.*, 2006). Para esto se utiliza un kit de TruSeq o Nextera. (II) Cada fragmento se replica para hacer un grupo de fragmentos idénticos (*clusters*). La estrategia de amplificación de ADN involucrada en esta etapa se denomina PCR de puente (Adessi *et al.*, 2000). Los amplicones (*clusters*) producidos a partir de un solo fragmento de ADN se agruparán en una única ubicación física en la celda de flujo. Después de la generación del *cluster*, el cebador de secuenciación se hibrida a la secuencia universal que flanquea la región de interés. Luego continúa la secuenciación por síntesis con una ADN polimerasa modificada y cuatro nucleótidos con terminadores reversibles. Cada ciclo extiende una sola base seguida por el clivaje químico del reportero fluorescente que identificará el nucleótido incorporado (Cao *et al.*, 2017). (III) Por último, se analizan los datos crudos del secuenciamiento.



Figura 7. Flujo de trabajo completo de secuenciación. El sistema HiSeq 4000 forma parte de un completo flujo de trabajo de secuenciación que incluye la preparación de la librería, la secuenciación y el análisis de datos (Modificado de Illumina®)

2.3.2 Análisis *in silico* de genomas

El análisis *in silico* o bioinformático de genomas permite aplicar técnicas informáticas para comprender y organizar la información asociada con macromoléculas biológicas, como lo es el ADN (Luscombe *et al.*, 2001).

La gran cantidad de información generada gracias a la investigación, así como la disponibilidad de programas computacionales, ha dado como resultado una explosión en la creación de los mismos. Para ello, se utilizan comandos que se basan en lenguaje de programación, mediante el cual es posible crear aplicaciones o programas que permiten realizar una o más tareas. Existen muchos lenguajes de programación, pero los más usados en el área de bioinformática son el Perl, Python y R (Humaní, 2009).

2.3.2.1 Ensamblaje

Como resultado del secuenciamiento se obtendrán pequeños fragmentos denominados lecturas (*reads*), que varían en longitud según la tecnología utilizada. A partir de estas lecturas se realiza el proceso conocido como ensamblaje *de novo*, el cual consiste en utilizar potentes algoritmos informáticos para unirlos, lo que resulta en tramos continuos más largos de secuencia (*contigs*). Para un ensamblaje correcto,

es importante que haya suficiente superposición entre las lecturas en cada posición en el genoma, lo que requiere una alta cobertura de secuenciación (o profundidad de lectura). Naturalmente, para lecturas más largas, se puede esperar una mayor superposición (Ekblom y Wolf, 2014).

El enfoque más utilizado para el ensamblaje de lecturas cortas se basa actualmente en los gráficos de De Bruijn, donde las lecturas se dividen en *k-mer* (secuencias de longitud *k*, más cortas que las lecturas) que luego forman los nodos del gráfico y son vinculados al compartir un *k-1 mer*. Los programas de ensamblaje más utilizados son SOAPdenovo (Luo *et al.* 2012), ABySS (Simpson *et al.* 2009) y Velvet (Zerbino y Birney 2008), todos se basan en el algoritmo de gráfico de De Bruijn.

2.3.2.2 Anotación

Después de ensamblar un genoma, el siguiente paso es la anotación. La anotación del genoma consiste en proveer información biológica relevante a las secuencias del genoma mediante el análisis de su estructura de secuencia y composición, así como considerar lo que sabemos de las especies estrechamente relacionadas, que se pueden usar como referencia (Dominguez Del Angel *et al.*, 2018).

Si bien la anotación del genoma implica caracterizar una gran cantidad de elementos biológicamente significativos en una secuencia genómica, el objetivo es la ubicación correcta de genes codificadores de proteínas, pseudogenes, genes de ARN (ARNrs, ARNts, entre otros) y regiones no traducidas. Este proceso lleva el nombre de anotación estructural. La anotación funcional asigna un rol biológico a las estructuras génicas predichas (Juscamayta, 2013; Dominguez Del Angel *et al.*, 2018).

En general, existen tres enfoques principales para predecir genes en un genoma: intrínseco (o *ab-initio*), extrínseco y combinado. El primero se enfoca únicamente en la información que se puede extraer de la secuencia genómica misma, como el potencial de codificación, mientras que la forma extrínseca utiliza la homología de

bases de datos conocidas (por ejemplo, ADN genómico, ADNc, y proteínas) como información (Azevedo *et al.*, 2011). Entre las herramientas más utilizadas para la predicción de genes para genomas procariotas se encuentran Glimmer (Delcher *et al.*, 2007) y Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010).

El resultado principal de la anotación funcional es la asignación de elementos funcionales a los genes. Estos pueden variar desde nombres y/o funciones putativas para genes codificantes de proteínas. La función de las proteínas predichas se infiere computacionalmente en función de la similitud entre la secuencia de interés y otras secuencias en diferentes repositorios públicos, por ejemplo BlastP contra Uniprot. No obstante, se debe tener cuidado al asignar resultados simplemente basados en la similitud de secuencia, ya que dos secuencias evolutivas independientes que comparten algunos dominios comunes podrían considerarse homólogas sin serlo (Galperin y Koonin, 1998). Afortunadamente, el número de secuencias en esos repositorios públicos está en aumento, lo que hace posible realizar varias búsquedas y combinar los resultados obtenidos en una sola anotación.

2.3.2.3 Identificación de factores de virulencia

La identificación y caracterización de los factores de virulencia, especialmente las toxinas, y los marcadores de resistencia a los antibióticos de los patógenos son cruciales para comprender la patogénesis bacteriana y sus interacciones con el huésped, así como para el desarrollo de nuevos fármacos, vacunas y herramientas de diagnóstico molecular (Bakour *et al.*, 2016).

Antes de la secuenciación del genoma, la identificación de los factores de virulencia se basaba en enfoques bioquímicos, o en la selección molecular de un panel de genes que desempeñasen un papel en la patogénesis mediante clonación molecular y/o mutagénesis. En el enfoque bioquímico, las toxinas bacterianas u otros factores de virulencia se purifican y luego se estudian sus efectos patógenos *in vivo* o *in vitro*.

Por otro lado, en el enfoque molecular, los genes de virulencia se analizan mediante mutagénesis y/o clonación y expresión en cepas no patógenas, por lo general *E. coli* (Mahan *et al.*, 1993).

En los últimos años, gracias a la genómica, la tasa de descubrimiento de factores de virulencia ha aumentado considerablemente. En el caso de los factores de virulencia de bacterias, estos pueden identificarse mediante la búsqueda de homología con genes de virulencia conocidos (Joensen *et al.*, 2014), comparando cepas con diversos niveles de virulencia (Perna *et al.*, 2001) o mediante el análisis de genes adquiridos horizontalmente (Karlín, 2001) (Figura 8).

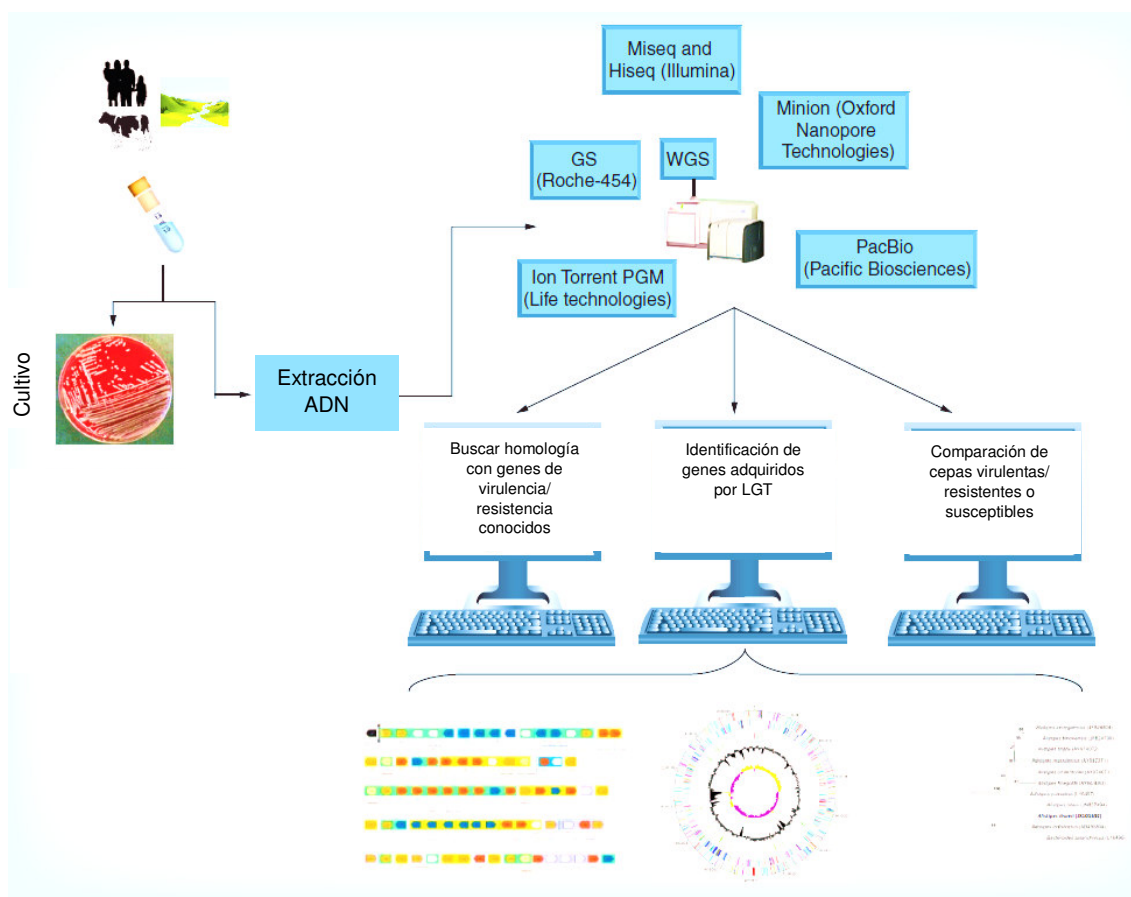


Figura 8. Flujo de trabajo para la identificación de los factores de virulencia y resistencia a los antibióticos de patógenos bacterianos. LGT: transferencia génica lateral; WGS: secuenciación del genoma completo (Modificado de Bakour *et al.*, 2016)

Una de las mejores alternativas para identificar genes de virulencia conocidos es realizar una selección a partir de bases de datos especializadas. Existe una gran cantidad de bases de datos dedicadas a los factores de virulencia, una de ellas es la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB) la cual contiene 1 067 factores de virulencia de patógenos bacterianos y 3 204 genes relacionados a factores de virulencia al 13 de Setiembre del 2018 (Chen *et al.*, 2016).

Existen también otras bases de datos que se limitan a factores de virulencia específicos, como toxinas o adhesinas. Por ejemplo, la base de datos T3DB incluye más de 15 000 genes para 3 673 toxinas (Wishart *et al.*, 2015). Además, muchas de estas herramientas de análisis del genoma utilizan criterios múltiples para detectar factores de virulencia. Este es el caso de MvirDB (Zhou *et al.*, 2007), la cual combina varias bases de datos, incluyendo PRINTS (Attwood *et al.*, 2012) y VFDB para identificar los factores de virulencia.

El mecanismo más importante de transferencia de genes y evolución en células procariotas se debe a la transferencia horizontal de genes (HGT) (Toussaint y Chandler, 2012). La HGT puede ocurrir entre especies relacionadas cercanas o distantes, por varios mecanismos que incluyen transformación natural, transducción y conjugación. En los genomas bacterianos, los genes adquiridos por el HGT se asocian a menudo con marcadores genéticos de los elementos genéticos móviles (MGE) con los que fueron transferidos (Hacker y Kaper, 2000). Los fragmentos genómicos adquiridos por HGT que contienen genes de virulencia se denominan islas de patogenicidad (PAI) (Yoon *et al.*, 2007).

La identificación de PAI en un genoma bacteriano permite detectar todos los genes de virulencia que contiene, incluidos aquellos que no son expresados por la bacteria. Esta detección se da gracias a que las PAI a menudo difieren en su composición de la base y el uso de codones en comparación con el genoma central. Lo cual permite su

detección mediante diversos métodos, como los análisis filogenéticos o el estudio del contenido de G + C y la variación del uso de codones o aminoácidos a lo largo del genoma (Oelschlaeger y Hacker, 2004).

Se han desarrollado varias bases de datos que pueden usarse para identificar posibles PAI. Entre ellas se encuentra la Base de Datos de la Isla de Patogenicidad (PAIDB), que contiene 112 tipos de islas de patogenicidad (Yoon *et al.*, 2007); la base de datos de IslandViewer, la cual propone un conjunto de herramientas bioinformáticas para detectar cualquier PAI contra una base de datos de 18 919 genes de virulencia de 1 277 genomas de patógenos bacterianos (Bertelli *et al.*, 2017).

Finalmente, es posible identificar genes involucrados en la virulencia, a partir del análisis genómico comparativo de cepas de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas que muestran diferentes niveles de patogenicidad entre cepas virulentas y no virulentas. Por ejemplo, Perna *et al.* (2001) realizaron la comparación de una cepa patógena de *E. coli* O157:H7 y una cepa no patógena de *E. coli* K-12, lo que permitió la identificación de 1 387 nuevos genes que eran específicos de la cepa patógena, varios de los cuales codificaban proteínas asociadas a la virulencia conocidas o hipotéticas.

2.3.3 Características generales del genoma de *Salmonella* Typhimurium

A la fecha, existen cerca de 56 genomas totalmente secuenciados y anotados de *Salmonella* Typhimurium disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Tabla 2). El primero de ellos fue el de la cepa de laboratorio LT2, que por mucho tiempo fue considerada como la única cepa representativa. Se reportaron dos secuencias en la cepa LT2, el cromosoma de 4 951 380 pb con un contenido de GC de 52% y el plásmido pSLT de 93 939 pb. En el cromosoma se identificaron 4 548 secuencias codificantes, de las cuales 39 fueron

pseudogenes, 7 *clusters* de ARNr y 85 ARNt (McClelland *et al.*, 2001). A pesar de su amplia aplicación en el análisis genético, esta cepa presenta virulencia atenuada en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Swords *et al.*, 1997), lo que llevó a muchos investigadores a buscar otros aislamientos de *S. Typhimurium* para examinar la base genética de la patogénesis bacteriana.

Posteriormente, se secuenció el genoma de la cepa 14028s (4 964 380 pb), lo cual permitió realizar la primera comparación directa de cepas de *Salmonella* pertenecientes al serovar Typhimurium. Ambas comparten más del 98% en la identidad de su secuencia genómica, sin embargo, mostraron diferencias en el contenido de profagos y pseudogenes, así como de polimorfismos genéticos que pueden explicar la diferencia de la virulencia entre ambas (Jarvik *et al.*, 2010). Tanto 14028s como LT2 poseen un plásmido de virulencia de 90 kb que promueve la replicación intracelular y la infección sistémica (Gulig y Curtiss, 1987), pero difieren en el contenido de profagos, como suele ser el caso entre las cepas de *S. Typhimurium* (Figueroa-Bossi y Bossi, 2004).

La cepa UK-1 de *S. Typhimurium* (*Universal Killer*) se aisló por primera vez del bazo de un pollito inoculado oralmente 3 días antes con una cepa de *S. Typhimurium* altamente virulenta recuperada por Curtiss *et al.* de un caballo infectado en 1991. El genoma de *S. Typhimurium* UK-1 está compuesto por un cromosoma de 4 911 150 pb y un plásmido de alta virulencia de 93 277 pb, denominado pSTUK-100. El cromosoma contiene 4 773 CDS que incluye 22 pseudogenes (Luo *et al.*, 2011). La comparación entre UK-1, LT2 y 14028s, reveló una alta colinealidad. Sin embargo, UK-1 contiene el menor número de profagos, pero exhibe la mayor virulencia entre las cepas estudiadas (Luo *et al.*, 2012).

Aunque las secuencias del genoma de varias cepas de *S. Typhimurium* como LT2, 14028s y UK-1 se encuentran disponibles en bases de datos públicas, secuencias

adicionales de *S. Typhimurium* serían un recurso valioso para mejorar nuestra comprensión de la biología de esta especie (Izumiya *et al.*, 2011). Gracias a la genómica, el análisis del genoma completo de múltiples cepas de una misma especie se ha convertido en un enfoque importante y necesario para entender las especies bacterianas, en particular, los patógenos con diversos factores de virulencia.

Tabla 2. Características generales de algunos genomas de *S. Typhimurium*

Cepa	NCBI RefSeq	Aislado	Tamaño (pb)	G+C	CDS
LT2	NC_003197.2	Laboratorio	4 951 380	52.22%	4 548
14028s	NC_016856.1	Pollo/ratón	4 964 100	52.22%	4 843
UK-1	NC_016863.1	Pollo	4 911 150	52.22%	4 773
D23580	NC_016854.1	Humano	4 879 400	52.20%	4 737

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/152?>

2.4 Herramientas bioinformáticas utilizadas

2.4.1 Prokka versión 1.12

Prokka comprende una colección de programas desarrollados por el *Victorian Bioinformatics Consortium*, para anotar completamente un borrador del genoma bacteriano (*draft genome*) en aproximadamente 10 minutos en una computadora de escritorio. Se basa en un sistema de línea de comandos que se puede instalar en cualquier sistema Unix. Para esto, coordina un conjunto de herramientas existentes para lograr una anotación rica y confiable de secuencias bacterianas genómicas (Seemann, 2014). Estas herramientas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Herramientas de predicción de funciones utilizadas por Prokka (Tomado de Seemann, 2014)

Herramienta	Características predichas
Prodigal (Hyatt <i>et al.</i> , 2010)	Secuencias codificantes (CDS)
RNAmmer (Lagesen <i>et al.</i> , 2007)	Genes de ARN ribosomal (ARNr)
Aragorn (Laslett y Canback, 2004)	Genes de ARN de transferencia (ARNt)
Infernal (Kolbe y Eddy, 2011)	ARN no codificante

Las proteínas que codifican los genes son anotadas en dos etapas. El programa Prodigal identifica las coordenadas de los posibles genes, mas no describe el producto genético putativo. Para llevar a cabo la anotación funcional, se compara cada gen con una gran base de datos de secuencias conocidas, generalmente a un nivel de secuencia de proteínas (BlastP), y se transfiere la anotación de la mejor coincidencia significativa.

Prokka utiliza el método de homología, pero de manera jerárquica, comenzando con una base de datos confiable más pequeña, moviéndose a bases de datos medianas pero de dominio específico, y finalmente a modelos curados de familias de proteínas. (Seeman, 2014). De forma predeterminada, se utiliza un umbral de valor-e de 10^6 con las siguientes bases de datos: UniProt (The UniProt Consortium, 2017), que contiene solo proteínas con evidencia experimental y la base de datos RefSeq para un género de bacteria específico. Si no se encuentran coincidencias con ninguna de estas bases de datos, el posible gen es etiquetado como 'proteína hipotética'.

2.4.2 BLAST versión 2.7.1

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) es un programa de búsqueda de similitud de secuencia que se puede utilizar para buscar coincidencias rápidamente a partir de una base de datos con la secuencia problema. Existen varias variantes de BLAST para comparar todas las combinaciones, ya sea de nucleótidos (BlastN) o proteínas (BlastP), con una base de datos de nucleótidos o proteínas, respectivamente. Además de realizar alineaciones, BLAST calcula estadísticos como el valor-e, información sobre la significancia de cada alineación. Asimismo, BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes (Altschul *et al.*, 1990).

2.4.3 BLAST Ring Image Generator (BRIG)

BRIG (Alikhan *et al.*, 2011) es capaz de generar imágenes de comparación circulares para genomas procariotas, mostrando múltiples comparaciones genómicas en una sola imagen, y mostrando similitud entre un genoma de referencia en el centro contra otras secuencias de consulta como un conjunto de anillos concéntricos coloreados según la identidad de BLAST. Utiliza CGView (Stothard y Wishart, 2005) para la generación de imágenes y BLAST (Altschul *et al.*, 1990) para comparaciones genómicas.

2.4.4 PHASTER

PHASTER (*PHAge Search Tool - Enhanced Release*) es una actualización significativa del popular servidor web PHAST (Zhou *et al.*, 2011) (www.phaster.ca) para la rápida identificación y anotación de secuencias de profagos dentro de los genomas bacterianos y plásmidos. El *pipeline* de análisis PHAST es relativamente sencillo. Este programa recibe información de la secuencia genómica en formato GenBank o FASTA como entrada, y realiza búsquedas con BLAST contra una base de datos personalizada de profagos/fagos que combina secuencias de proteínas de la base de datos de fagos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) y la base de datos de profagos desarrollada por Srividhya *et al.* (2006). Los genes de tipo fago se agrupan en regiones de profago utilizando DBSCAN (Ester *et al.*, 1996). Todos los datos del profago anotado se muestran en la web a través de una variedad de tablas con hipervínculos y mapas cromosómicos de colores. Aunque los pasos en el *pipeline* de identificación de fagos en PHASTER siguen siendo en gran medida los mismos que en PHAST, numerosas mejoras ahora han hecho a PHASTER más rápido, más eficiente, más atractivo visualmente y mucho más fácil de usar (Arndt *et al.*, 2016).

2.4.5 PlasmidFinder versión 2.0

PlasmidFinder contiene una base de datos que incluye todos los replicones identificados en aproximadamente 559 plásmidos pertenecientes a 40 especies bacterianas diferentes de la familia *Enterobacteriaceae*. Esta base de datos se usó para crear una herramienta web (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) utilizando el algoritmo BlastN para buscar homologías de ADN en datos de secuenciación sin procesar y ensamblados de cuatro plataformas de secuenciación diferentes. Si los genomas o plásmidos bacterianos ensamblados se cargan en el servicio web, se convierten inmediatamente en una base de datos BLAST. Para que se reporte una secuencia como similar, se debe cubrir al menos el 60% de la longitud de la secuencia del replicón en la base de datos. Los datos de salida incluyen información sobre qué fragmento de ADN (*contig*) se encontró y la posición de la secuencia dentro de este *contig*. Además, la información sobre el %ID, la cobertura y la longitud de la secuencia del replicón se incluye en los datos de salida Carattoli *et al.*, 2014).

2.5 Bases de datos

2.5.1 Uniprot

Universal Protein Resource (UniProt; <https://www.uniprot.org/>) es un recurso integral para la secuencia de proteínas y los datos de anotación. Las bases de datos de UniProt son *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB), *UniProt Reference Clusters* (UniRef) y *UniProt Archive* (UniParc). Esta base de datos contiene más de 60 millones de secuencias, de las cuales más de medio millón de secuencias han sido curadas por expertos que revisan críticamente los datos experimentales y predichos para cada proteína (The UniProt Consortium, 2017).

2.5.2 Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB)

La Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB, por sus siglas en inglés; (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) es un recurso en línea integrado y completo para identificar información sobre los factores de virulencia (FV) de los patógenos bacterianos. Desde su inicio en 2004, VFDB se ha dedicado a proporcionar un conocimiento actualizado de los FV de diversos patógenos bacterianos de importancia médica. Estos factores de virulencia incluyen: toxinas, enzimas, polisacáridos capsulares, proteínas de membrana externa, entre otros (Tabla 4) (Chen *et al.*, 2016).

Tabla 4. Resumen de los factores de virulencia que presenta la VFDB

Resumen estadístico	
Tipo de datos	Número
Patógenos (por género)	74
Factores de virulencia verificados experimentalmente	1067 567
Cepas de bacterias involucradas con genoma completo	951 529
Genes relacionados a factores de virulencia	32252
Literatura relacionada	2556

Fuente: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/status.htm>

2.5.3 Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos (CARD)

La Base de Datos Integral de Resistencia a los Antibióticos (CARD) proporciona datos, modelos y algoritmos relacionados con las bases moleculares de la resistencia antimicrobiana, con énfasis en los genes, proteínas y mutaciones involucradas en este proceso. CARD proporciona secuencias de referencia curadas y SNPs organizados a través de la *Antibiotic Resistance Ontology* (ARO). Estos datos se pueden consultar en el sitio web (<https://card.mcmaster.ca/home>) o descargar en varios formatos. Además, se asocian adicionalmente con modelos de detección para

la predicción de resistoma a partir de secuencias moleculares. Estos modelos se pueden descargar o se pueden usar para el análisis de secuencias genómicas utilizando el *Resistance Gene Identifier* (RGI), ya sea en línea o como una herramienta independiente (Jia *et al.*, 2017)

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

H_i: Existen zonas en el genoma de una cepa de *Salmonella* Typhimurium que contienen genes de virulencia responsables de la salmonelosis en cuyes

H₀: No existen zonas en el genoma de una cepa de *Salmonella* Typhimurium que contienen genes de virulencia responsables de la salmonelosis en cuyes

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo General

Caracterizar la capacidad virulenta a nivel genómico de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de casos de salmonelosis en cuyes mediante el análisis *in silico*

3.2.2 Objetivos Específicos:

- a. Identificar genes asociados a virulencia, profagos, determinantes de resistencia antibióticos y plásmidos del genoma de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de cuy.
- b. Comparar los factores asociados a virulencia de una cepa de *Salmonella* Typhimurium aislada de cuy con otras de la familia *Enterobacteriaceae*.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Información Genómica

Información genómica de *Salmonella* Typhimurium aislada de vesícula de cuy con cuadro de salmonelosis, secuenciado y anotado en la Sección de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.2 Material de laboratorio

Equipo

- Servidor core i7, 16GB RAM, 1TB DD.
- Sistema operativo Linux

Programas

- *Software* Prokka
- *Software* DnaPlotter
- *Software* PHASTER
- *Software* BRIG
- *Software* BLAST versión 2.7.1
- *Software* PlasmidFinder 2.0

4.3 Métodos

4.3.1 Aislamiento e identificación molecular de la cepa bacteriana

La cepa de *Salmonella* Typhimurium VET1 fue obtenida a partir de un trabajo de investigación previo (Marcelo, 2015). Donde fue aislada de la vesícula de un cuy con signos clínicos compatibles con salmonelosis, de una crianza familiar-comercial en el departamento de Lima. Para su identificación se realizaron pruebas bioquímicas y moleculares, mediante los cuales se amplificaron secuencias específicas de los genes *invA* y *fljC*, que identifican el género *Salmonella*, y el serovar Typhimurium respectivamente (Jamshidi *et al.*, 2010).

4.3.2 Diseño del flujo de trabajo

Todos los programas utilizados en el presente trabajo fueron instalados y corridos localmente en un Servidor Core i7, 16 GB RAM, 2 TB Disco duro, en la plataforma BioLinux 8, distribución Ubuntu 14.04. Del mismo modo, todas las bases de datos empleadas fueron creadas y almacenadas de manera local en el servidor. La identificación de las potenciales regiones codificantes del genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1, así como la identificación de factores de virulencia, se realizó mediante un flujo de trabajo utilizando programas bioinformáticos (Figura 9)

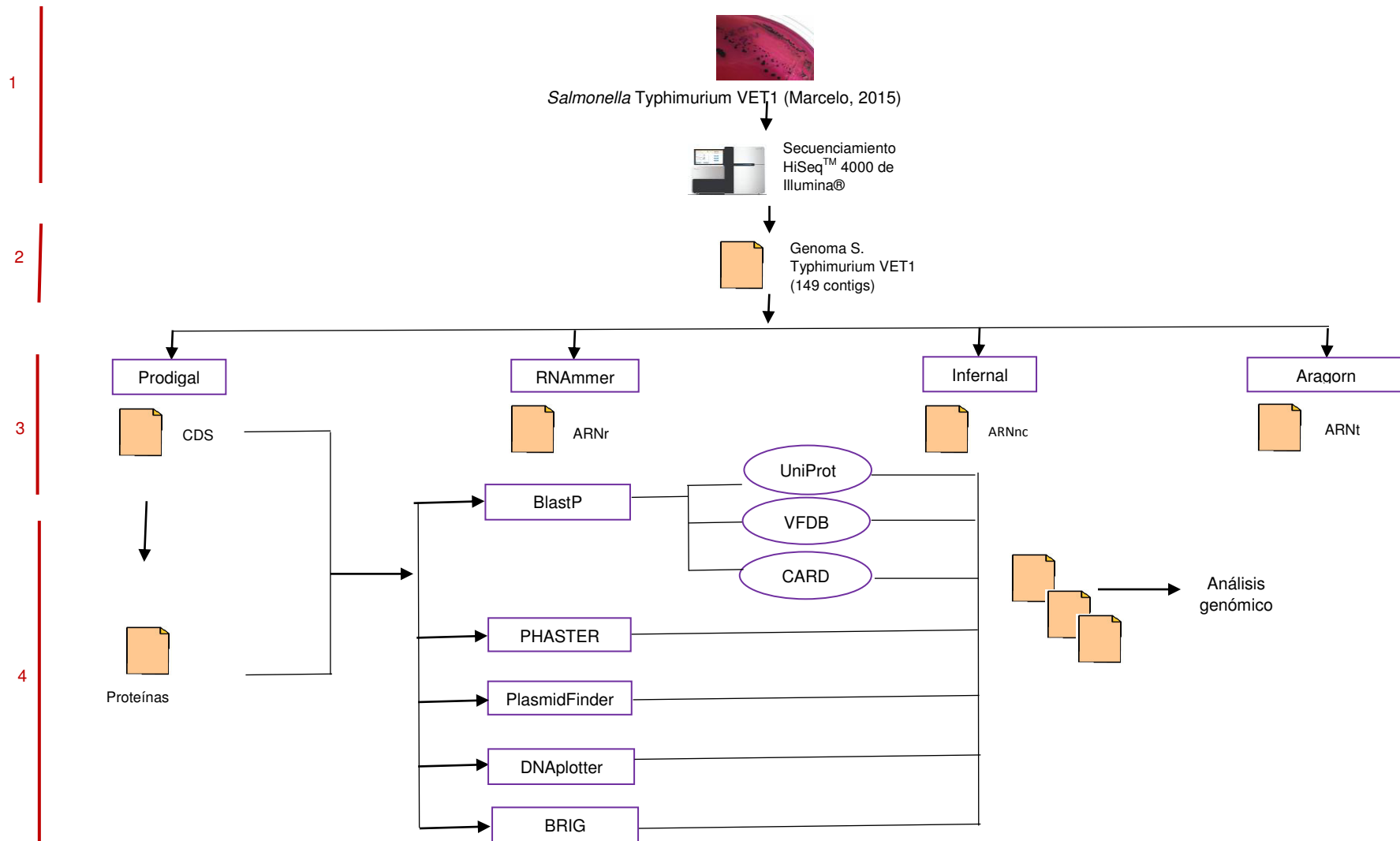


Figura 9. Flujo de trabajo de laboratorio para la anotación y predicción de factores de virulencia del genoma de *Salmonella Typhimurium* cepa VET1. Se representan los cuatro procedimientos: secuenciación y procesamiento del genoma (1); ensamblaje (2); anotación estructural (3) y anotación funcional y análisis genómico (4).

4.3.3 Secuenciamiento total del genoma de *S. Typhimurium* VET1

S. Typhimurium VET1 fue enviada a Macrogen™ (Seúl, República de Corea) para el secuenciamiento total del genoma. Para la preparación de la librería se utilizó el protocolo TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Guide, Part #15036187 Rev. A de Illumina® que generó fragmentos por ambos extremos con lecturas de 101 nucleótidos (*paired-end reads*). El secuenciamiento de siguiente generación se realizó utilizando la tecnología HiSeq™ 4000 de Illumina®.

4.3.4 Ensamblaje y Anotación del genoma

Para evaluar la calidad de las lecturas obtenidas y determinar la presencia de los adaptadores añadidos durante la preparación de las librerías, se utilizó el programa FastQC (Babraham Institute, Bioinformatics). Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) descartó las lecturas de baja calidad y realizó la limpieza de secuencias índices y adaptadores. Las secuencias que cumplieron estos criterios se ensamblaron luego usando Velvet versión 1.2.10 (Zerbino y Birney, 2008). Finalmente, se utilizó el programa QUAST (Gurevich *et al.*, 2013) para hallar los estadísticos y parámetros del ensamblado.

La identificación de secuencias codificantes fue realizada a través de la herramienta de anotación para genomas procariotas Prokka (Seemann, 2014). La anotación estructural se llevó a cabo con el programa Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), el cual halló las secuencias codificantes de proteínas del genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1, los cuales fueron identificados en los mismos *contigs*. La anotación funcional se realizó mediante la herramienta BlastP del paquete BLAST+ (Camacho *et al.*, 2009), el cual realizó una búsqueda local de homología contra las bases de datos del UniProt (The UniProt Consortium, 2017), que contiene solo proteínas con evidencia experimental que no son fragmentos. Adicionalmente, las herramientas RNAmmer

(Lagesen et al., 2007) y Aragorn (Laslett y Canback, 2004) se utilizaron con sus opciones por defecto para hallar ARNr y ARNt respectivamente. El programa Infernal (Kolbe y Eddy, 2011) se utilizó para la identificación de ARN no codificante (ARNnc).

4.3.5 Mapeo genómico

Para visualizar el genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1, se realizó el mapeo circular de su genoma junto con los genomas de las cepas LT2, 14028S, D23580 y UK-1, usando el software BRIG (Alikhan et al., 2011). El genoma de referencia (cepa VET1) fue sometido a comparación por BLAST contra los genomas completos de las cepas LT2, 14028S, D23580 y UK-1, en formato fasta, para la localización de estructuras genómicas similares. Además, fue posible visualizar variaciones de GC y sesgo de GC (*GC skew*).

Del mismo modo, DNAPlotter (Carver et al., 2009) se utilizó para generar la imagen del mapa de ADN circular del genoma de *S. Typhimurium* VET1, lo cual permitió mostrar regiones y características de interés.

4.3.6 Multi Locus Sequence Type (MLST)

Se determinó el tipo de secuencia (ST) de *Salmonella* Typhimurium VET1 utilizando MLST. Los fragmentos internos de 7 genes constitutivos (*aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *pure*, *sucA* y *thrA*) de *S. enterica* se obtuvieron al consultar la base de datos en línea de MLST (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>) (Enterobase), los cuales fueron identificados con BlastN en la cepa de estudio. Los números de alelos se asignaron según las instrucciones de la base de datos en línea de MLST (Enterobase). Luego, las combinaciones únicas de estos siete alelos se tradujeron en el tipo de secuencia numérica (ST).

Además, en EnteroBase, los ST se organizan en grupos complejos clonales eBURST, que definen un fundador y a sus genotipos derivados (Feil *et al.*, 2004). Los alelos y el ST obtenido para *S. Typhimurium* fueron comparados con los reportados en la EnteroBase.

4.3.7 Identificación de Factores de Virulencia

Para la identificación de factores de virulencia, se realizó la búsqueda por homología con factores de virulencia conocidos. Las proteínas de *Salmonella Typhimurium* VET1 fueron analizadas con BlastP contra la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFBD, <http://mgc.ac.cn/VFs/>) (Chen *et al.*, 2016), considerando un valor-e $\leq 1e-30$.

Las secuencias de los posibles factores de virulencia fueron seleccionadas de acuerdo a su valor-e, identidad > 90% (Wang *et al.*, 2017), longitud del alineamiento y en función a publicaciones previas.

4.3.8 Identificación de determinantes de resistencia a antibióticos

Se aplicó BlastP para alinear las secuencias de aminoácidos de *Salmonella Typhimurium* VET1 contra la Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) (Jia *et al.* 2017). Se eligieron secuencias de aminoácidos con una longitud de alineación superior al 90% y una identidad de coincidencia superior al 90%, y se asignó la descripción del mejor resultado (con el mayor porcentaje de longitud de alineación e identidad de coincidencia) como la anotación del gen predicho.

Antes de realizar los alineamientos, se descargaron e instalaron localmente en el servidor los archivos en formato FASTA de cada una de las bases de datos utilizadas (VFDB y CARD).

4.3.9 Identificación de profagos y plásmidos

El genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1 se analizó mediante la Herramienta Mejorada de Búsqueda de Fagos (PHASTER, <http://phaster.ca/>) para identificar la presencia de profagos (Arndt *et al.*, 2016). Solo los profagos identificados como "completos" o "intactos" se consideraron para el análisis. La identidad de todas las secuencias de profagos intactas detectadas por PHASTER fue confirmada por BLAST.

También se analizó utilizando PlasmidFinder (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). En este caso, las secuencias de replicones de la base de datos PlasmidFinder fueron analizadas por BLAST contra el genoma de *S. Typhimurium* VET1, y los resultados de la mejor coincidencia para cada secuencia de replicones se obtuvieron como datos de salida, utilizando un valor de umbral de ID del 80%.

5. RESULTADOS

5.1 Anotación estructural y funcional

La cepa VET1 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium presenta un genoma de 4 905 041 pb (Figura 10), que fue distribuido en 149 contigs con un N50 de 114 656 pb. Se identificó 4 885 genes, de los cuales 4 630 fueron CDS y 255 ARN, incluyendo 2 de ARNr, 56 ARNr y 197 ARNnc. Además, el genoma presentó un 52.14% de GC (Tabla 5).

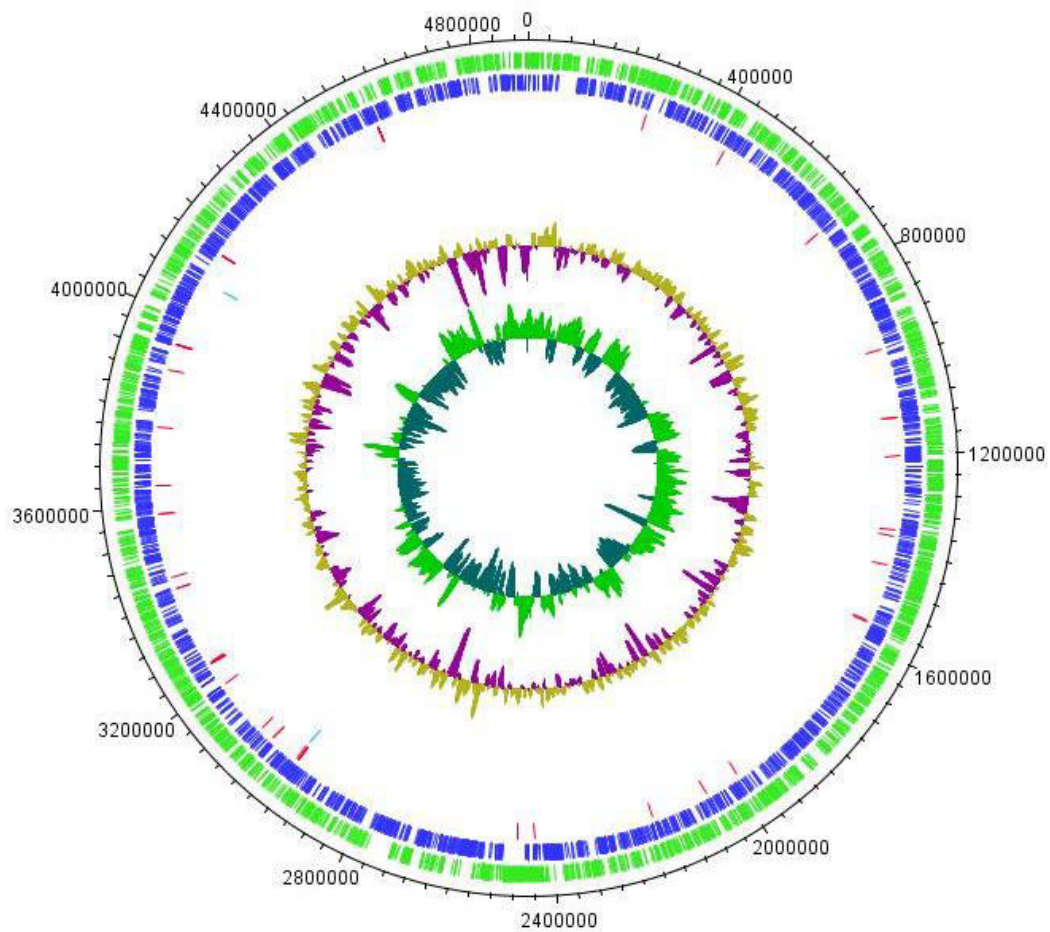


Figura 10. Mapa circular del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VET1. Desde el círculo exterior y yendo hacia adentro se muestra al genoma *Salmonella* Typhimurium cepa VET1 como una gráfica circular, siendo el anillo verde y el anillo azul las secuencias codificantes en la cadena *forward* y *reverse* respectivamente, en rojo se muestran las secuencias ARNr y en celeste las de ARNt. El penúltimo anillo muestra el %GC y el último el Sesgo de GC (GC skew) [(G-C)/(G+C)].

Tabla 5. Características generales del genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1

Característica	Valor
Tamaño del genoma (bp)	4 905 041
N° Contigs	149
%GC	52.14
Genes totales	4 885
Genes codificantes (CDS)	4 630
ARNr	56
ARNt	2
ARNnc	197
N° de probables factores de virulencia*	244

*Utilizando la base de datos VFDB.

Del total de genes predichos, 69.3% (3 385) fueron asignadas con una función conocida, 25.1% (1 227) fueron asignados como proteínas hipotéticas (sin función conocida) y 5.6% (273) fueron asignados con función putativa.

5.2 Análisis de MLST

Salmonella Typhimurium VET1 fue asignada a ST19 utilizando MLST. Los perfiles alélicos de los genes *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *pure*, *sucA* y *thrA* fueron 10, 7, 12, 9, 5, 9 y 2. ST19 se encuentra en el número 1 del grupo eBURST (eBG1) o en el complejo ST 1.

5.3 Mapeo genómico

Se observa que el genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1 presenta alta homología con los genomas de las cepas LT2, 14028S, D23580 y UK-1 (Figura 11). Lo cual es común en este serovar. Asimismo, se observa las regiones de las SPI-1, todas totalmente conservadas en los 5 genomas. En rojo se encuentran las regiones correspondientes a los profagos, de los cuales resalta la presencia de 118970_sal3 en la cepa VET1.

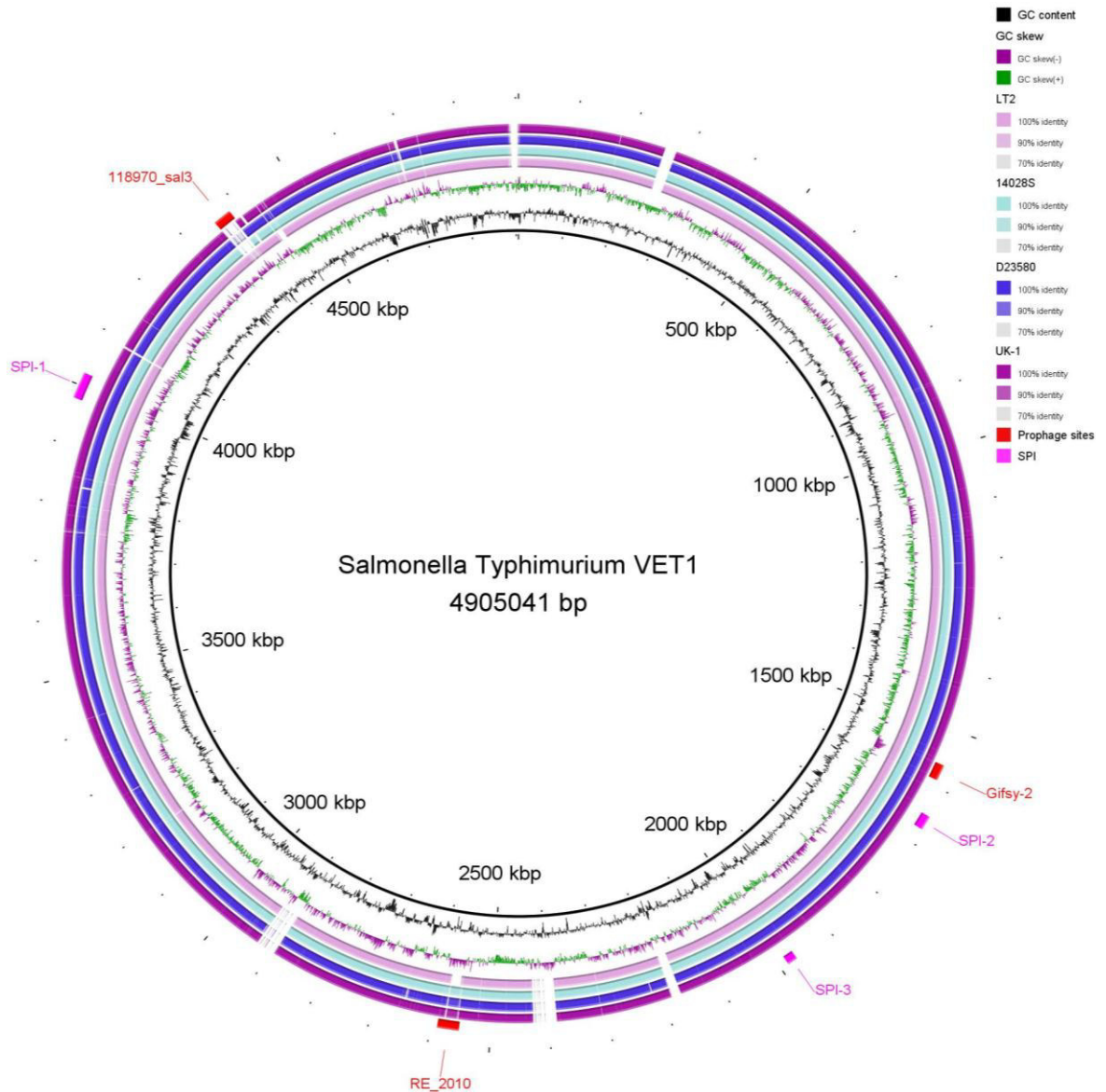


Figura 11. Visualización de la comparación de genomas y la identificación SPI1-3 y profagos. El primer anillo representa el genoma de referencia, *S. Typhimurium VET1*; el segundo anillo muestra el contenido GC%, el tercer anillo muestra el GC Skew; el cuarto anillo muestra la homología con el genoma *S. Typhimurium LT2* (rosa), el quinto anillo muestra homología con el genoma *S. Typhimurium 14028S* (celeste); el sexto anillo muestra la homología con el genoma *S. Typhimurium D23580* (azul); el séptimo anillo muestra la homología con el genoma *S. Typhimurium UK-1*. De rojo se muestran las regiones de profagos y de fucsia las SPI.

5.4 Identificación de factores de virulencia

Se realizó el análisis genómico para la identificación de factores de virulencia, a partir de la secuencia del genoma completo de *Salmonella Typhimurium VET1*. 244

posibles proteínas asociadas a virulencia fueron identificadas utilizando la base de datos de VFDB, bajo un riguroso valor-e $\leq 1e-30$ y una identidad $> 90\%$ (Anexo 1). De estos, el 31.97% representa factores de virulencia asociados al sistema de secreción tipo III (TTSS), el 27.87% a factores de adherencia y el 20.49% a proteínas asociadas a motilidad. Entre estas tres funciones se encuentra cerca del 80% de factores de virulencia codificados por *Salmonella Typhimurium* VET1. En menor proporción se encuentran los factores de virulencia relacionados a regulación transcripcional (5.74%), proteínas de membrana externa (3.69%), proteínas de invasión (1.23%), captura de hierro (1.64%) y captura de magnesio (0.82%) (Figura 12).

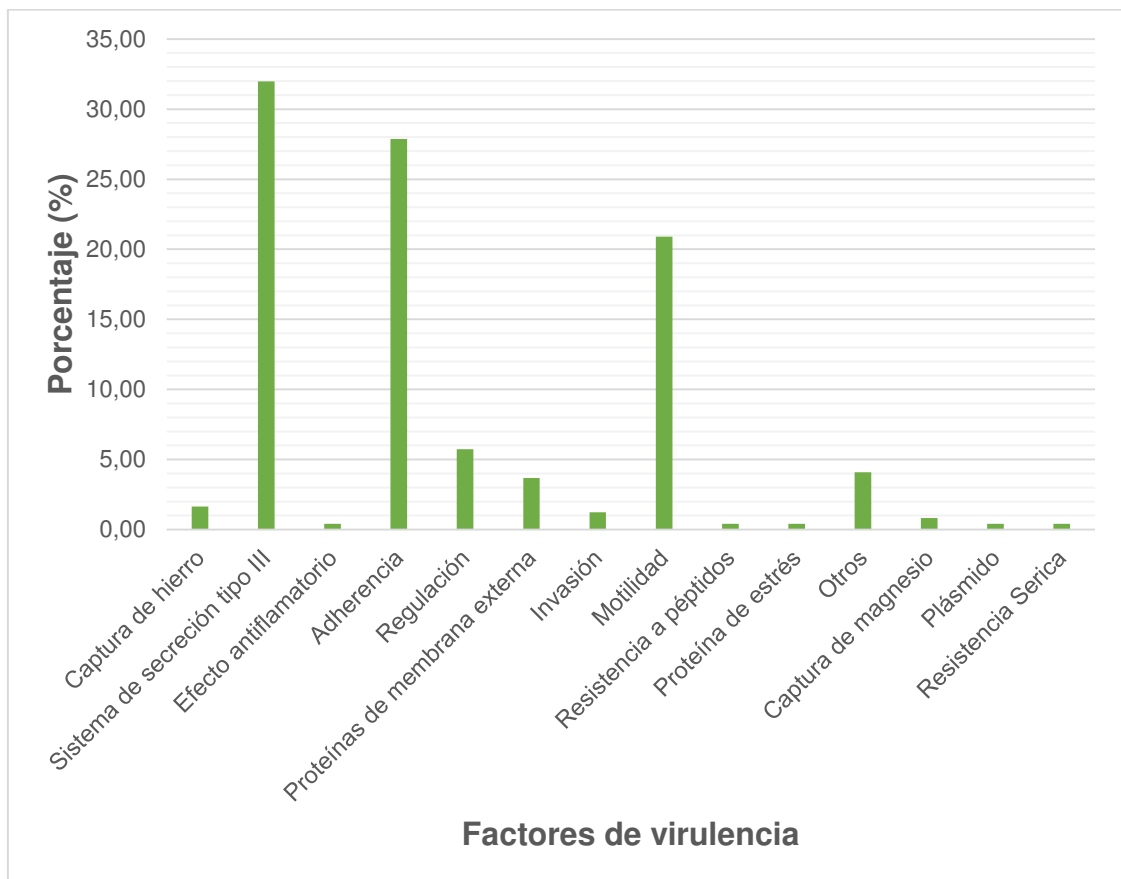


Figura 12. Porcentaje de factores de virulencia de *Salmonella Typhimurium* VET1 obtenidos durante la búsqueda contra la base de datos de factores de virulencia (VFDB)

El 95.9% de los factores de virulencia tuvo homología con la cepa *Salmonella* Typhimurium LT2. Sin embargo, un 4.10% tuvo homología con diferentes especies como: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*. Todas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

5.5 Identificación de determinantes de resistencia a antibióticos

Se consultó la base de datos CARD para identificar genotipos relacionados con la resistencia en el genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1. Se identificaron un total de 16 proteínas relacionadas a resistencia antimicrobiana, que pertenecen a 6 familias diferentes de genes de resistencia a antibióticos (valor-e $\leq 1e-30$ y una identidad $> 90\%$). Entre estas, 8 proteínas fueron homólogas a las de *Salmonella* Typhimurium LT2, 7 a *Escherichia coli* y 1 a *Salmonella* Enteritidis (Tabla 6). Además, *S.* Typhimurium VET1 contiene 13 proteínas relacionadas con los mecanismos de bombeo de eflujo de antibióticos, incluida la bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND), el Casete de unión a ATP (ABC), la Bomba de eflujo de antibióticos para la superfamilia del facilitador principal (MFS) y el Transportador de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE) (Tabla 6).

Además, los *loci* cromosómicos que forman parte de estas bombas de flujo de múltiples antibióticos incluyen: *acrB*, *mdtK*, *patA*, *acrD*, *golS* y *mdsABC*. Se identificaron los genes *sdiA*, *acrD*, *CRP*, *acrB*, *mdsABC*, *mdtG*, que son conocidos por estar relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, cefalosporina, cloranfenicol y fosfomicina, respectivamente.

Tabla 6. Lista de proteínas de resistencia identificadas por CARD

BlastP CARD								
ORF	Proteína involucrada en AMR	Familia de genes AMR	GI	valor-e	%ID	Longitud del alineamiento (aa)	Mecanismo de resistencia	Clase de droga
orf00111	YojI (<i>Escherichia coli</i>)	Casete de unión a ATP (ABC)	ARO:3003952	0	90.86	547	Bomba de eflujo de antibióticos	microcin J25
orf00600	GolS	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000504	1e-113	100	154	Bomba de eflujo de antibióticos	fenicol carbapenem cefamicina cefalosporina
orf00602	MdsA	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000789	0	100	408	Bomba de eflujo de antibióticos	fenicol carbapenem cefamicina cefalosporina
orf00603	MdsB	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000790	0	99.91	1055	Bomba de eflujo de antibióticos	fenicol carbapenem cefamicina cefalosporina
orf00604	MdsC	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000791	0	100	485	Bomba de eflujo de antibióticos	fenicol carbapenem cefamicina cefalosporina
orf00993	CRP	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000518	1e-156	99.05	210	Bomba de eflujo de antibióticos	penam fluoroquinolona macrólido
orf01326	AcrD (<i>Escherichia coli</i>)	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000491	0	94.21	1037	Bomba de eflujo de antibióticos	aminoglucósido
orf01443	BacA (<i>Escherichia coli</i>)	Proteínas relacionadas con undecaprenil pirofosfato	ARO:3002986	0	97.07	273	Alteración del antibiótico objetivo	bacitracina

orf01457	PatA (<i>Escherichia coli</i>)	Casete de unión a ATP (ABC)	ARO:3000024	0	94.54	458	Bomba de eflujo de antibióticos	fluoroquinolona
orf02049	MdtG (<i>Escherichia coli</i>)	Bomba de eflujo de antibióticos para la superfamilia del facilitador principal (MFS)	ARO:3001329	0	90.32	403	Bomba de eflujo de antibióticos	fosfomicina
orf02062	MdtH (<i>Escherichia coli</i>)	Bomba de eflujo de antibióticos para la superfamilia del facilitador principal (MFS)	ARO:3001216	0	92.54	402	Bomba de eflujo de antibióticos	fluoroquinolona
orf02567	AAC(6')-Iaa	AAC (6 ') antibiótico aminoglucósido	ARO:3002571	9e-108	99.31	145	Inactivación de antibióticos	-
orf02567	AAC(6')-Iy (<i>Salmonella</i> Enteritidis)	AAC (6 ') antibiótico aminoglucósido	ARO:3002569	6e-107	97.93	145	Inactivación de antibióticos	-
orf03237	AcrB (<i>Escherichia coli</i>)	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000216	0	94.57	1049	Bomba de eflujo de antibióticos	fluoroquinolona cefalosporina tetraciclina rifamicina
orf03436	MdtK	Transportador de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE)	ARO:3001327	0	99.58	474	Bomba de eflujo de antibióticos	fluoroquinolona
orf04042	SdiA	Bomba de eflujo de antibióticos por resistencia-nodulación-división celular (RND)	ARO:3000826	0	100	240	Bomba de eflujo de antibióticos	fluoroquinolona cefalosporina tetraciclina rifamicina

ORF= marco abierto de lectura; AMR= resistencia antimicrobiana; %ID = % Identidad; GI = Identificador de la proteína involucrada en AMR; (-) = no hubo información.

5.6 Identificación de profagos y plásmidos

El programa PHASTER pudo identificar 6 regiones relacionadas con profagos. Las secuencias identificadas como profagos intactos tienen un tamaño promedio de 31.6 kb, la más pequeña (27.2 kb) perteneciente al profago Gifsy 2 y la más grande (36.6 kb) del profago 118970_sal3. Sin embargo, se identificó la presencia de otros restos de profagos (incompleto o cuestionable) en múltiples regiones, como los profagos *Edwardsiella* GF-2, BcepMu y Bacteriófago N15 (Tabla 7).

Tabla 7. Lista de profagos identificados por PHASTER

Profago	Integridad	Longitud de la región	N° de proteínas	%GC
Gifsy 2	Intacto	27.2 kb	30	53.63
118970_sal3	Intacto	36.6 kb	50	50.51
RE-2010	Intacto	31.1 kb	39	52.55
Edwardsiella phage GF-2	Cuestionable	22 kb	28	53.07
Bacteriophage N15	Incompleto	14 kb	21	54.26
BcepMu	Incompleto	20.4 kb	30	50.56

También se detectó que la cepa VET1 alberga los plásmidos IncFII(S) e IncFIB(S). El primero es homólogo (longitud del alineamiento de 262pb, identidad de secuencia de 100%) a un plásmido de *Salmonella* Typhimurium caracterizado previamente (GenBank: CP000858). El segundo presentó una homología en 643 pb con 100% de identidad con otro plásmido caracterizado de la misma especie (GenBank: FN432031).

6. DISCUSIÓN

En la era de la Secuenciación de Siguiete Generación, el análisis del genoma completo se ha convertido en un enfoque importante y necesario para comprender los diversos factores de virulencia. Este trabajo es pionero en el uso de la secuenciación del genoma completo (WGS) para analizar *Salmonella* en un caso clínico de salmonelosis en cuyes. WGS es una herramienta precisa que, cuando se combina con la predicción *in silico* del fenotipo (identificación de serotipos, capacidad virulenta y mecanismos de resistencia antimicrobiana adquiridos) ayuda a rastrear y vigilar la evolución y propagación del patógeno. Debido a esto, en el presente trabajo se realizó la caracterización de la capacidad virulenta a nivel genómico de una cepa de *Salmonella* Typhimurium mediante el análisis *in silico*, con la finalidad de identificar potenciales factores de virulencia asociados a la salmonelosis en cuyes. Se realizó la anotación del genoma utilizando el *pipeline* de Prokka (Seemann, 2014), lo cual permitió identificar 4 885 marcos abiertos de lectura (ORF) en el genoma de *Salmonella* Typhimurium VET1 con un total de 4 905 041 pb y un contenido de GC de 52.14% (Tabla 5). Del total de genes identificados en este genoma, 4 630 fueron genes codificantes para proteínas. De la comparación entre genomas de *S. Typhimurium* (Tabla 2), el tamaño genoma y el número de genes codificantes de *S. Typhimurium* VET1 son comparables a las anotaciones de genomas previamente reportadas de *Salmonella* Typhimurium LT2 (4 951 380 pb; 4 548 CDS), *Salmonella* Typhimurium D23580 (4 879 400 pb; 4 737 CDS) y *Salmonella* Typhimurium UK-1 (4 911 150 pb; 4 773 CDS) (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Mediante el uso de un enfoque basado en la secuencia de nucleótidos conocido como *Multi Locus Sequence Type* (MLST, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), se realizó el genotipado de *S. Typhimurium* VET1. Para *S. enterica*, MLST se basa en la comparación de secuencias internas de siete genes constitutivos (*aroC*, *dnaN*, *hemD*,

hisD, *purE*, *sucA* y *thrA*) (Achtman *et al.*, 2012). De hecho, MLST se ha propuesto como un sistema alternativo para la clasificación de los aislados de *Salmonella* que reemplaza la serotipificación tradicional (Wattiau *et al.*, 2011). El presente trabajo reveló que VET1 está clasificado como ST19, que incluye las cepas LT2, UK-1, SL1344 y 14028s del serovar Typhimurium, entre otras; siendo el perfil alélico 10, 7, 12, 9, 5, 9 y 2 para cada uno de los genes constitutivos respectivamente. ST19 se observa comúnmente entre las cepas aisladas de *S. Typhimurium* en todo el mundo, incluido los países sudamericanos; incluso actualmente se predice como la cepa fundadora de todo *Salmonella* (Wiesner *et al.*, 2009). Entre las técnicas disponibles para la tipificación entre bacterias, se decidió emplear MLST ya que pocos estudios han utilizado hasta ahora este método para analizar los diferentes serovares y cepas de *Salmonella* en Perú. El único reporte hasta la fecha es el trabajo realizado por Silva *et al.* (2017), donde caracterizaron aislados de *Salmonella enterica* provenientes de humanos utilizando múltiples métodos de tipificación. Los ST encontrados fueron 11, 19, 10, 85 y 32 para los serovares Enteritidis, Typhimurium, Dublin, Paratyphi A e Infantis, respectivamente. Con esto se mostró que todos los aislamientos del mismo serovar pertenecían al mismo ST, siendo ST19 el asignado para *Salmonella Typhimurium*, el cual es el mismo al reportado para la cepa VET1. Además, el resultado del presente trabajo también concuerda con los encontrados por Wiesner *et al.* (2009) para el serovar Typhimurium a partir de cepas aisladas en México. Sin embargo, estos mostraron una mayor diversidad de ST (ST19, ST213, ST302 y ST429), lo cual podría estar relacionado con el aislamiento a partir de de fuentes más diversas (animales y humanos).

La caracterización de la virulencia de la cepa VET1 se realizó mediante la predicción de sus factores de virulencia, profagos, determinantes de resistencia antibióticos y plásmidos, basado en el análisis de su genoma. Esto dio como resultado 244 posibles proteínas asociadas a virulencia, las cuales fueron obtenidas mediante la búsqueda

contra la Base de Datos de Factores de Virulencia (VFDB, <http://mgc.ac.cn/VFs/>) (Chen *et al.*, 2016) (Anexo 1). Asimismo, se identificó un total de 16 proteínas relacionadas a resistencia antimicrobiana, las cuales fueron obtenidas mediante BlastP contra la Base de Datos Integral de Resistencia a Antibióticos (CARD, <https://card.mcmaster.ca/>) (Jia *et al.* 2017) (Tabla 6). Se utilizó PHASTER <http://phaster.ca/>) (Arndt *et al.*, 2016) para identificar 6 regiones relacionadas con profagos, de las cuales 3 estuvieron intactos (Gifsy, 118970_sal3 y RE-2010), uno cuestionable (Edwardsiella phage GF-2) y dos incompletos (BcepMu y Bacteriophage N15) (Tabla 7). El motivo por el cual se decidió ignorar los fagos cuestionables e incompletos, se fundamenta en que estos últimos pueden representar fagos crípticos, es decir, que no pueden codificar el gen de la integrasa. Mientras que los fagos cuestionables no contienen suficientes genes de profago para ser considerados fagos funcionales completos (Colavecchio *et al.*, 2017). Por lo tanto, solo se seleccionaron los fagos intactos para asegurar una homología de secuencia precisa. Los plásmidos identificados fueron IncFII(S) e IncFIB(S), obtenidos gracias a la herramienta PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (Carattoli *et al.*, 2014).

Entre los potenciales factores de virulencia identificados, el 31.97% representa factores de virulencia asociados al sistema de secreción tipo III (TTSS), el 27.87% a factores de adherencia y el 20.49% a proteínas asociadas a motilidad. En menor proporción se encuentran los factores de virulencia relacionados a regulación transcripcional (6.15%), proteínas de membrana externa (3.69%), proteínas de invasión (1.23%), captura de hierro (1.64%) y captura de magnesio (0.82%) (Figura 12). Los factores de virulencia se encuentran íntimamente asociados con las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI). En *S. Typhimurium*, existen 12 SPI conocidas que presentan diferentes factores de virulencia: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-6, SPI-9, SPI-11, SPI-12, SPI-13, SPI-14 y SPI-16 (Chiu *et al.* 2005; Haneda *et al.* 2009). En este contexto, para describir el repertorio genético virulento

de la cepa VET1, se analizó la integridad de los genes dentro de las SPI, como algunas fimbrias, adhesinas y genes de motilidad. Además se identificó que SPI-1 y 2 presentan todos los genes intactos (Anexo 1).

Siguiendo la clasificación dada por la VFDB, el mayor porcentaje (31.97%, 77 proteínas) de los factores de virulencia identificados en *Salmonella* Typhimurium VET1 corresponden a proteínas involucradas en el sistema de secreción de tipo III (Figura 12), este puede ser codificado por SPI-1 (T3SS-1) o SPI-2 (T3SS-2). El primero desempeña un papel importante en la invasión de *Salmonella* de la célula huésped; mientras que T3SS-2 es esencial para la supervivencia intracelular del patógeno (Fàbrega y Vila, 2013). Por lo tanto, los sistemas de secreción de tipo III son los principales factores de virulencia de *Salmonella* y han sido ampliamente estudiados en varios modelos animales. Sin embargo, no existen muchos estudios que hayan investigado su papel durante la infección en cuyes.

Los genes que conforman T3SS ubicados en SPI-1 incluyen *prgHIJK*, *spaSRQPO* e *invABCEFGH* (genes estructurales), así como múltiples genes reguladores (*hilA*, *hilB* e *hilC*) y efectores (*sipADCB*) (Kaur y Jain, 2012). Se predijo que VET1 posee el operón *sipADCB* (orf00239 – orf00242), el cual está altamente conservado en *S. Typhimurium* LT2 con genes que comparten más del 99% de identidad de nucleótidos (Anexo 1). Por ejemplo, SipA (99.85% identidad), es un efector de tipo III que comparte similitud de secuencia de aminoácidos con IpaA, una proteína de *Shigella* spp. que es necesaria para la entrada eficiente de bacterias en las células epiteliales (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997). Además, estudios previos que utilizaron modelos de infección bovina y murina demostraron que muchas proteínas efectoras de TTSS, como SipA, SopA, SopB, entre otras, exhibieron patogenicidad entérica reducida al portar mutaciones en sus genes (Hapfelmeier *et al.*, 2004).

Dentro del operón *invABCEFGH* destaca la presencia de la proteína InvA (orf00253), la cual presentó un 100% de identidad en sus 685 aminoácidos de longitud. InvA participa en la invasión de las células del epitelio intestinal y ha sido demostrado que contiene secuencias exclusivas de *Salmonella*, por lo tanto su detección es rápida y específica utilizando PCR y posee diversas aplicaciones en diagnóstico (Rahn *et al.*, 1992). Esto coincide con el estudio previo realizado por Marcelo (2015), donde logró identificar el 100% de cepas aisladas de cuy previamente caracterizadas como *Salmonella* spp. mediante la técnica de PCR utilizando el gen *invA*.

Otras proteínas estructurales de T3SS-1 identificadas en la cepa VET1 fueron PrgK, PrgJ, PrgI, PrgH (orf00228 - orf00231) que presentan 100% de identidad con *S. Typhimurium* LT2. Lo mismo sucedió con los productos del operón *spaSRQPO* (orf00244 - orf00248). Todos estos componentes son necesarios no solo para la secreción de proteínas efectoras sino también para la formación del complejo de agujas (Kosarewicz *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se identificaron los genes que conforman T3SS ubicados en SPI-2. Principalmente el operón *ssaG* hasta el *ssaU* (orf01649 - orf01664) (Anexo 1) con un 100% de identidad en todos sus productos, los cuales forman parte de la estructura del aparato T3SS-2. Estas proteínas solo se expresan dentro de la célula huésped SCV (vacuola que contiene *Salmonella*) y facilitan la transferencia de efectores a través de la membrana de SCV para interactuar con los objetivos en las células huésped (Hensel, 2000).

Un 27.87% de los potenciales factores de virulencia identificados en VET1 corresponden a proteínas relacionadas a adherencia (Figura 11). Entre ellas destacan la proteína MisL (orf02832, con una identidad del 100%), perteneciente a la familia de autotransportadores (AT) y ubicada en la SPI-3. Esta fue recientemente analizada por Wang *et al.* (2018), quienes indicaron que MisL participa en la formación, agregación

y adherencia de biopelículas bacterianas. Además, demostraron que la inmunización con la proteína MisL recombinante estimuló la producción de títulos elevados de anticuerpos IgG, que confirieron una protección moderada contra la infección por *S. Typhimurium* en ratones. Esto sugiere que MisL tiene efectos inmunoprotectores y podría ser un nuevo candidato vacunal para la prevención de infecciones causadas por *Salmonella Typhimurium*. Interesantemente, se han utilizado varios AT como componentes esenciales de las vacunas (Cutter *et al.*, 2002), lo cual ha demostrado que los anticuerpos contra estos pueden inhibir significativamente la adherencia de bacterias patógenas (Zhu-Ge *et al.*, 2015). Por lo tanto, la inhibición de la colonización bacteriana inicial podría ser una estrategia efectiva para prevenir infecciones bacterianas.

Las fimbrias (pili) son estructuras superficiales filamentosas que contribuyen a la colonización del epitelio por *Salmonella* y por ende cumplen una importante función en la adhesión (Foley *et al.*, 2013). De los trece *loci* fimbriales predichos para ser codificados por el genoma de *S. Typhimurium*, la cepa VET1 los posee en su totalidad con una identidad mayor al 98% (Anexo 1). Sin embargo, solo los *loci* *lpf*, *fim*, *bcf*, *stb*, *stc*, *sth* y *csg* han sido implicados en la virulencia en ratones (Weening *et al.*, 2005). Los roles de la mayoría de estas fimbrias son desconocidos, ya que la mayoría no se producen en condiciones de laboratorio, sino únicamente *in vivo* (Laniewsk *et al.*, 2017). Por ejemplo, Laniewsk *et al.* (2017) utilizaron la tecnología de expresión *in vivo* (IVET) para identificar que *agf*, *saf*, *sti* y *stc* se expresaban activamente en el bazo durante la infección y cuando los cuatro operones fueron eliminados se produjo una reducción significativa de la virulencia. Por ende, la identificación de las fimbrias producidas durante la infección proporcionaría información importante sobre cómo estas estructuras contribuyen en la salmonelosis en cuyes y potencialmente inducirían inmunidad protectora a la infección por *Salmonella*.

Seguidamente, el 20.90% de factores de virulencia se encuentran asociados a la motilidad, la cual es considerada una estrategia de virulencia importante. Existen dos tipos de motilidad en *S. Typhimurium* y ambas dependen de apéndices superficiales, llamados flagelos (Wiedemann *et al.*, 2014). El flagelo de *Salmonella enterica* se compone de una única proteína, la flagelina, que puede ser codificada por *fliC* y *fljB* (Joys, 1985). El primero (orf03525) tiene una identidad de 97.48% con la cepa LT2, mientras que la del segundo (orf01214) es 99.75%. Los flagelos son reconocidos como PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) utilizados por el huésped para reconocer bacterias y, además de su función en la motilidad, se ha demostrado que en *S. Typhimurium* estimulan el sistema inmunitario innato y adaptativo (Kawai y Akira, 2011). De hecho, Miao *et al.* (2010) demostraron que una cepa de *S. Typhimurium* que fue manipulada para ser incapaz de regular la expresión de *fliC* intracelular se atenuó durante la infección sistémica.

Un 5.74% de las proteínas identificadas están relacionadas con la regulación transcripcional de los factores de virulencia. Entre las proteínas reguladoras identificadas, se encuentra HilA (orf00233, 100% de identidad), la cual es clave para la expresión de los genes SPI-1 que codifican componentes del sistema de secreción tipo III (Bajaj *et al.*, 1995).

De igual forma, *Salmonella* posee una gran cantidad de genes que confieren resistencia al estrés ácido, los cuales al inactivarse producen reducción de la virulencia (Wilmes-Riesenberg *et al.*, 1996). En este sentido, las proteínas reguladoras RpoS (orf00283, identidad 100%), Fur (orf00923, identidad 100%) y PhoPQ (orf02130 y orf02131, identidad 100%) fueron identificadas en el genoma de VET1 y son todas necesarias para conferir resistencia al estrés ácido (Lee *et al.*, 1995; Hall y Foster, 1996; Bearson *et al.*, 1998). RpoS controla la expresión de los genes *spv* del plásmido de virulencia del serovar Typhimurium (Fang *et al.*, 1992). Las

proteínas codificadas por el locus *spvRABCD* (orf03145 - orf03153, identidad 100%) controlan la tasa de crecimiento de *Salmonella* en órganos profundos y son necesarios para la infección sistémica y la bacteriemia en animales y humanos (Gulig *et al.*, 1993). De hecho, Coynault *et al.* (1996) demostraron que los mutantes *rpoS* tienen menor capacidad para colonizar los bazos de ratones infectados, lo que resulta en la avirulencia de la cepa. Además, demostraron que estas mutaciones reducen la capacidad del serovar Typhimurium para colonizar las placas de Peyer de ratones infectados. Del mismo modo, Prouty *et al.* (2002) demostraron que los mutantes de *phoP*, *phoQ* o *phoPQ* son totalmente avirulentos para los ratones y altamente inmunogénicos para inducir inmunidad protectora frente a las cepas virulentas salvajes. Esto sugiere que el sistema PhoPQ regula la transcripción de una multitud de genes de virulencia de *Salmonella* Typhimurium y podría ser considerado un buen blanco para la producción de vacunas.

El 3.19% de los factores de virulencia corresponde a proteínas de membrana externa (Figura 12). Aquí resalta la presencia de la proteína iroN, que se encuentra en todos los miembros de *S. entérica* (Bäumler *et al.*, 1998). IroN (orf00126, identidad 99.86%) es un receptor de membrana externa para la captación de quelantes de hierro, denominados sideróforos, lo que indica un papel en la adquisición de hierro bacteriano (Rabsch *et al.*, 1999). La proteína OmpD (orf02614, identidad 100%) es la porina más abundante en la membrana externa de *S. Typhimurium* (Ipinza *et al.*, 2014). Sin embargo, su rol en la virulencia ha sido controvertido, ya que en muchos casos su inactivación no tuvo impacto en la adherencia o invasión de las células epiteliales del intestino humano (Meyer *et al.*, 1999). Mientras que otros estudios sugirieron que OmpD bloqueaba la unión de bacterias a los macrófagos peritoneales murinos (Negm y Pistole, 1998). Recientemente, Perez-Toledo *et al.* (2016) demostraron que la porina OmpD de *S. Typhimurium* es altamente inmunogénica,

capaz de generar una respuesta de anticuerpos de clase IgM y de subclases de IgG que se mantiene durante 260 días tras la inmunización.

Interesantemente, las proteínas STM4574 y STM4575 (orf04180 y orf04181) (Anexo 1) fueron predichas como proteínas de membrana externa (OMP) putativas. Se sabe que las OMP conectan la célula con el ambiente, representando así importantes factores de virulencia con un papel importante en la patología de las bacterias gramnegativas y la adaptación bacteriana (Hamid y Jain, 2008). Sin embargo, la estructura y función de estas en *S. Typhimurium* aún es desconocida (Bogomolnaya *et al.*, 2014).

Por otro lado, entre las proteínas relacionadas a la invasión (1.23%) se encuentra la lacP (orf00238) ubicada en la SPI-1 con un 100% de identidad (Anexo 1). Esta proteína se ha asociado previamente con la invasión de las células epiteliales, así como con la virulencia de *S. Typhimurium* durante la infección en ratones (Kim *et al.*, 2011).

Entre las proteínas identificadas relacionadas a la captura de hierro (1.64%) (Figura 12) se encuentra el *cluster iroBCDE* (orf00122 - orf00125) (Anexo 1). En general estas proteínas son considerados como potenciales candidatos vacunales, ya que según Costa *et al.* (2016), *S. Typhimurium* requiere hierro como un nutriente esencial para el crecimiento. Además, estudios realizados por Caza *et al.* (2008) con plásmidos que contenían diferentes combinaciones de genes *iro* demostraron que, en particular, los genes *iroN* (que codifica para una proteína de membrana externa) e *iroC*, así como la combinación de los genes *iroD* e *iroE*, eran críticos para la virulencia.

Se identificó el operon *mgtCB* en la SPI-3 (Blanc-Potard *et al.*, 1999) que codifica las proteínas de membrana MgtC y MgtB (orf02823 y orf02825) (Hmiel *et al.*, 1989).

Ambos se requieren para el crecimiento en concentraciones bajas de Mg^{2+} y tienen un papel relevante en la supervivencia dentro de los macrófagos (Retamal *et al.*, 2009).

Asimismo, entre las proteínas homólogas identificadas se encuentran algunas pertenecientes a especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Entre ellas, *Klebsiella pneumoniae* (4), *Escherichia coli* (3), *Klebsiella oxytoca* (2) y *Shigella flexneri* (1) (Anexo 1). Resalta la presencia del orf01962, que presenta un 92.86% de identidad con la proteína OmpA de *E. coli*. Esta es una proteína principal conservada en su membrana externa y participa en varias interacciones entre la célula huésped (Hsueh-Hsia *et al.*, 2009). Otra de las proteínas es GtrB de *Shigella flexneri* (orf03671, identidad 90.2%) (Anexo 1), la cual modifica los lipopolisacáridos por glucosilación, contribuyendo así a la adhesión e invasión del patógeno (Mattock y Blocker, 2017). Este dato sugiere que el mecanismo y los factores involucrados en el proceso de modificación de lipopolisacáridos se conservan entre *Salmonella Typhimurium* y *Shigella flexneri*.

Dado que la cepa VET1 fue aislada de una crianza familiar-comercial que pudo estar expuesta al uso de antibióticos, fue necesario identificar si esta cepa poseía resistencia a ellos. Para esto, se realizó BlastP contra la base de datos CARD, la cual identificó múltiples sistemas de flujo codificados cromosómicamente y sus genes reguladores (Tabla 6). Las bombas de eflujo de antibióticos se componen principalmente de la familia de resistencia-nodulación-división celular (RND), superfamilia de facilitadores principales (MFS), casetes de unión de ATP (ABC) y transportadores de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE).

Los nueve transportadores de antibióticos putativos que se han sido identificados como parte del genoma de *S. Typhimurium* son AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC, EmrAB, MdfA, MdtK y MacAB (Nishino *et al.*, 2006). Entre estos, el AcrAB, AcrD, MdtK y MdsABC fueron identificados en la cepa VET1 (Tabla 6). Las nueve

bombas de eflujo en *S. Typhimurium* desempeñan un papel importante en la virulencia, además de conferir el fenotipo MDR al organismo (Baugh *et al.*, 2012; Nishino *et al.*, 2006). No obstante, la regulación de la expresión de las bombas de eflujo a menudo implica una respuesta de estrés bacteriano, por ejemplo, durante las interacciones huésped-patógeno (Srinivasan *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que la mayoría de los aislados de *Salmonella* porta al menos un gen de resistencia a aminoglucósidos (*aac (6') - laa* o *aac (6') - ly*) (Leon *et al.*, 2018), lo cual concuerda con lo identificado en la cepa VET1 (Tabla 6). Sin embargo, estos genes son crípticos, es decir, parecen haber alcanzado sus límites evolutivos y ya no producen resistencia fenotípica (Salipante y Hall, 2003). De hecho, el gen *aac (6') - ly* ha sido asociado con el transporte de carbohidratos en *Salmonella* (Magnet *et al.*, 1999). Los aminoglucósidos, como estreptomycin y gentamicina, son antibióticos de alta prioridad que se utilizan para tratar la salmonelosis en cuyes (Matsuura *et al.*, 2010), lo cual sustenta la ausencia de genes de resistencia a este antibiótico en VET1.

Por otro lado, los cuatro profagos funcionales únicos que se conservan en el serovar Typhimurium son Fels-1 y -2, Gifsy-1 y -2, aunque Fels-1 y -2 varían mucho dentro de las cepas (Figuroa-Bossi *et al.* 2001). De estos, PHASTER solo identificó la región intacta de Gifsy-2 en el genoma de VET1 (Tabla 7). Los profagos Gifsy albergan genes que contribuyen a la replicación intracelular de *S. Typhimurium*, que es importante en el proceso de colonización de las cepas patógenas (Klumpp y Fuchs, 2007). Sin embargo, también se detectó la presencia de los profagos 118970_sal3 y RE-2010 (Tabla 7). Interesantemente, de los 50 CDSs predichos para el fago 118970_sal3, 21 codifican para proteínas hipotéticas, lo cual coincide con lo reportado por Paradiso *et al.* (2016). Siendo este el único reporte hasta la fecha del fago 118970_sal3 (familia *Myoviridae*) infectando a *S. Typhimurium*. Paradiso *et al.* (2016)

también mostraron que 118970_sal3 tiene una identidad del 86.1% con el fago ST64B de *S. Typhimurium*. Es importante resaltar que el profago ST64B ha sido detectado en cepas de Estados Unidos, Reino Unido, Dinamarca y Nueva Zelanda (Price-Carter *et al.* 2011) pero no se ha descrito en cepas peruanas antes. No se identificaron genes asociados a la resistencia a los antibióticos en este fago. Sin embargo, se requerirá un análisis adicional para asignar funciones potenciales a varios genes no identificados e hipotéticos.

Adicionalmente, se detectó la presencia del fago RE-2010 (Tabla 7), el cual está asociado a *S. Enteritidis*, que a su vez está estrechamente relacionado con el fago Fels-2 (Hanna *et al.*, 2012). De hecho, un estudio realizado por Mohammed y Cormican (2015) fue el primero en reportar la presencia de este fago dentro de cepas de *S. Typhimurium*.

La diversidad de fagos tiene un profundo impacto en el medio ambiente y la evolución de las bacterias. Además, la caracterización genómica de diferentes fagos de *Salmonella* puede proporcionar información sobre la evolución de este patógeno, la propagación de los genes de virulencia y la resistencia a los antibióticos dentro de este género bacteriano (Paradiso *et al.* 2016), así como sobre el repertorio de fagos en cada cepa individual.

Detectamos que la cepa VET1 también alberga los plásmidos IncFII(S) e IncFIB(S). Este último contiene segmentos que corresponden al plásmido pSLT-BT, que alberga múltiples genes de virulencia (*spv*, *rck*, *pef*, *srgA* y *mig-5*) (Kingsley *et al.*, 2009), muchos de los cuales fueron detectados en la cepa VET1. El plásmido pSLT-BT está estrechamente relacionado con pSLT, un plásmido asociado a la virulencia esencial para la invasividad sistémica de *S. Typhimurium* en ratones (Gulig *et al.* 1993).

En resumen, en el presente trabajo se ha secuenciado el genoma completo de *Salmonella Typhimurium* VET1, aislado de un cuy con signos clínicos de

salmonelosis, y hemos caracterizado su capacidad virulenta mediante el análisis *in silico*. El genoma de la cepa VET1 contiene una gran cantidad de genes que codifican proteínas de resistencia a antibióticos, así como los principales factores de virulencia de *Salmonella*, incluidos los T3SS y sus efectores de virulencia producidos por SPI-1 y SPI-2 o en cualquier otro lugar del cromosoma, y determinantes de virulencia multifacéticos producidos por SPI-3, SPI-4, fagos, plásmidos, entre otros. La información genómica proporcionada en este estudio será útil para comprender los mecanismos moleculares de la patogénesis de esta bacteria, así como para el descubrimiento de nuevos determinantes de virulencia que puedan utilizarse como candidatos en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de salmonelosis en cuyes.

7. CONCLUSIONES

1. El genoma *Salmonella* Typhimurium VET1 presenta 4 885 secuencias codificantes, de las cuales 3 385 (69.3%) fueron asignadas con una función.
2. El tipo de secuencia asignado para *S.*Typhimurium VET1 utilizando MLST fue ST19.
3. En el análisis para la identificación de factores de virulencia del genoma de *S.* Typhimurium, el 80.33% de proteínas identificadas codifican para factores de adherencia, proteínas de motilidad y proteínas del sistema de secreción tipo III (TTSS), siendo estas últimas las más representativas (31.97%).
4. *S.* Typhimurium VET1 presenta 5 transportadores de antibióticos (AcrAB, AcrD, MdtK y MdsABC) de los 9 reportados para *Salmonella* Typhimurium.
5. Se identificaron los profagos Gifsy-2, RE-2010 y 118970_sal3, siendo este último muy raramente reportado en *S.* Typhimurium.
6. Un 4.10% de los factores de virulencia de *S.* Typhimurium VET1 presenta homología con diferentes especies de la familia *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*.

8. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar la calidad del ensamblado y realizar una anotación manual
2. Se sugiere combinar estos resultados con un enfoque genómico funcional para analizar los factores de virulencias y determinar su importancia en la patogénesis.
3. Se recomienda la evaluación de los factores de virulencia potencialmente inmunogénicos.
4. Se recomienda realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana para confirmar los genotipos de resistencia.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abulreesh H. 2012. Salmonellae in the environment. *Salmonella—Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies*, B. Annous and J. B. Gurtler, Eds., pp. 19–50, InTech.
- Achtman M, Wain J, Weill FX, Nair S, Zhou Z, Sangal V, *et al.* 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog*; 8(6):e1002776
- Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermoud JJ, Mayer P. 2000. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 28:E87
- Agasan A, Kornblum J, Williams G. 2002. Profile of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Subspecies I) Serovar 4,5,12:i:-strains causing food-borne infections in New York City. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, pp. 1924–1929.
- Aguado, M. 2013. Caracterización y análisis funcional del genoma de *Lactococcus garvieae*. Tesis para optar el grado de Doctor. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. 166 p.
- Alikhan N, Beatson S, Petty N, Zakour B. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*. Aug 8; 12:402
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403-410
- Ameghino C. 1968. Sobre un brote de salmonelosis en cuyes (*Cavia cobaya*). Extr. IVITA (3): 260-261.
- Antunes P, Mourão J, Campos J, Peixe L. 2016. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, Volume 22, Issue 2, 110 – 121

Arndt D, Grant J, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. 2016. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*.

Attwood TK, Coletta A, Muirhead G *et al.* 2012. The PRINTS database: a fine-grained protein sequence annotation and analysis resource – its status in 2012. *Database (Oxford)* bas019.

Azevedo V & de Abreu V, Almeida S, Santos A, Soares S, Ali A, Pinto A, Magalhanes A, Barbosa E, Ramos R, Cerdeira L, Carneiro A, Schneider P, Silva A, Miyoshi A. 2011. Whole genome annotation: *in silico* analysis. 10.5772/23724.

Bajaj V, Hwang C, Lee CA. 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* 18:715–727.

Bakour S, Sankar SA, Rathored J, Biagini P, Raoult D, Fournier PE. 2016. Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future microbiology*; 11: 455.

Bartholomew M, Heffernan R, Wright J, Klos R, Monson T, Khan S, Trees E, Sabol A, Willems R, Flynn R, Deasy M, Jones B, Davis J. 2014. Multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infection associated with Pet Guinea Pigs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 14(6): 414-421.

Baugh S, Ekanayaka AS, Piddock LJV, Webber MA. 2012. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2409–2417

Bäumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64(5):1862–1865.

- Bäumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W. 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 180:1446-53.
- Bearson BL, Wilson L, Foster JW. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J. Bacteriol.* 180:2409–2417.
- Beneneson S, Raveh D, Schlesinger Y, Alberton J, Rudensky B, Hadas-Halpern I, Yinnon AM. 2002. The risk of vascular infection in adult patients with nontyphi *Salmonella* bacteremia. *Am J Med.* 110: 60-63
- Bertelli C, Laird MR, Williams KP, Simon Fraser University Research Computing Group, Lau BY, Hoad G, Winsor GL, Brinkman FFSL. 2017. IslandViewer 4: Expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Research.*
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 181:998 –1004.
- Bogomolnaya LM, Aldrich L, Ragoza Y, Talamantes M, Andrews KD, McClelland M, Andrews-Polymeris HL. 2014. Identification of novel factors involved in modulating motility of *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *PloS one*, 9(11), e111513.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. 2000. *Salmonella* nomenclature *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 7, pp. 2465–2467, 2000.
- Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. 2004. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:560–602.

Caffer M, Terragno R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Buenos Aires: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Enfermedades infecciosas. 37p

Canchari A. 1995. El cuy, manual práctico para su crianza en la comunidad. Ministerio de Agricultura. PRONAMACHCS. 180 p.

Cano J. 2012. Efecto de la suplementación de probiótico líquido sobre los parámetros productivos en cuyes (*Cavia porcellus*) durante la fase de crecimiento y engorde. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

Cao Y, Fanning S, Proos S, Jordan K, Srikumar S. 2017. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in Microbiology*. 8:1829

Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H. 2014. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M and Parkhill J. 2009. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* (Oxford, England). 25;1;119-20

Caza M, Lépine F, Milot S, Dozois CM. 2008. Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infection and immunity*, 76(8), 3539-49.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), CDC Health Information for International Travel. 2016. *Oxford University Press*, New York, NY, USA, 2016

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Surveillance for foodborne disease outbreaks--United States, 2009-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2013; 62: 41-7.

Chauca L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.htm>. [Accedido el 24 de Agosto 2018]

Chen LH, Zheng DD, Liu B, Yang J and Jin Q. 2016. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acids Res.* 44(Database issue):D694-D697

Chilcott GS, Hughes KT. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:694 –708.

Chiu CH, Tang P, Chu C, Hu S, Bao Q, Yu J, Chou YY, Wang HS, *et al.* 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* 33, 1690–1698

Clayton DJ, Bowen AJ, Hulme SD, Buckley AM, Deacon VL, Thomson NR, Barrow PA, Morgan E, Jones MA, Watson M, Stevens MP. 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* 2008, 8:228

Coburn B, Grassl GA, Finlay BB. 2007. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85:112–118.

Colavecchio A, D'Souza Y, Tompkins E, Jeukens J, Freschi L, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Bekal S, Tamber S, Levesque RC, Goodridge LD. 2017. Prophage integrase typing is a useful indicator of genomic diversity in *Salmonella enterica*. *Frontiers in microbiology*, 8, 1283.

Collazo CM, Galán JE. 1997. The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* 24(4):747–756

Costa LF, Mol JP, Silva AP, Macêdo AA, Silva TM, Alves GE, Winter S, Winter MG, Velazquez EM, Byndloss MX, Bäumlér AJ, Tsolis RM, Paixão TA, Santos RL. 2016. Iron acquisition pathways and colonization of the inflamed intestine by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 306(8), 604-610.

Coynault C, Robbe-Saule V, Norel F. 1996. Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the *RpoS* (sigma S) regulon. *Mol. Microbiol.* 22:149–160.

Curtiss RI, Porter SB, Munson M, Tinge SA, Hassan JO, Gentry-Weeks C, Kelly SM. 1991. Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry, p. 169–198. In L. C. Blankenship, J. S. Bailey, N. A. Cox, S. E. Craven, R. J. Meinersmann, and N. S. Stern (ed.), Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* live vaccines for poultry. *Academic Press, Inc.*, San Diego, CA

Cutter D, Mason KW, Howell AP. 2002. Immunization with *Haemophilus influenzae* Hap adhesin protects against nasopharyngeal colonization in experimental mice. *J Infect Dis.* 186:1115-21

Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, Salzberg SL. 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer, *Bioinformatics* 23:6, 673-679.

Diard M, Hardt WD. 2017. Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiol Rev* 22:fux023.

Dominguez Del Angel V, Hjerde E, Sterck L et al. Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation [version 1; referees: 2 approved]. 2018. *F1000 Research* 2018, 7(ELIXIR):148

Dos Santos AMP, Ferrari RG, Conte-Junior CA. 2018. Virulence factors in *Salmonella Typhimurium*: The sagacity of a bacterium. *Curr Microbiol*

- Ekblom R, Wolf JBW. 2014. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary Applications published by John Wiley & Sons Ltd* 7, 1026–1042
- Ellermeier JR, Slauch JM. 2007. Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:24–29.
- Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NSA, Ser HL, Chan KG, Lee LH. 2015. *Salmonella*: a review on pathogenesis epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 8(3):284–293
- Ester M, Kriegel H, Sander J, Xu X. 1996. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In: KDD-1996 Proceedings. AAAI Press, Menlo Park, pp. 226–231.
- Evans AR. 2014. Biosecurity risk assessment: Guinea pig *Cavia porcellus* from Australia. Disponible en: https://members.wto.org/crnattachments/2014/sps/NZL/14_3682_01_e.pdf. [Accedido el 30 de Agosto 2018]
- Fàbrega A, Vila J. 2013. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308–341.
- Fang FC, Libby SJ, Buchmeier NA, Loewen PC, Switala J, Harwood J, Guiney DG. 1992. The alternative sigma factor katF (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11978–11982
- Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. 2006. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 34:e22.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol.* 186(5):1518±30

Figuroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. 2001. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39, 260–271.

Figuroa-Bossi N, Bossi L. 2004. Resuscitation of a defective prophage in *Salmonella* cocultures. *J. Bacteriol.* 186:4038–4041

Figuroa I, Verdugo A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM* 47: 25-42

Foley S, Johnson T, Ricke S, Nayak R, Danzeisen J. 2013. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77 (4) 582-607

Fournier J., Knox K., Harris M., Newstein M. 2015. Family outbreaks of Nontyphoidal Salmonellosis following a meal of Guinea Pigs. *Case Reports in Infectious Diseases*. Vol. 2015, Article ID 864640, 3p.

Fox J, Cohen B, Loew F. 1984. Laboratory Animal Medicine. 1° Ed. Orlando: *Academic Press*. 766 p.

Francis CL, Starnbach MN, Falkow S. 1992. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella* Typhimurium grown under low-oxygen conditions. *Mol. Microbiol.* 6:3077–3087

Freitas Neto OC de, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior A. 2010. Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12(1) 01-11.

Firdich E, Whitfield C. 2005. Review: Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J. Endotoxin Res* 11, 133–144

Fu Y, Galán JE. 1998. The *Salmonella* typhimurium tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* 27(2):359–368

Galán JE, Curtiss R. 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16):6383–6387

Galperin MY, Koonin EV. 1998. Sources of systematic error in functional annotation of genomes: domain rearrangement, non-orthologous gene displacement and operon disruption. *In Silico Biol.* 1(1): 55–67.

Ganaway JR. 1976. The biology of the guinea pig. Academic Press, New York.

Gart EV, Suchodolski JS, Welsh TH Jr, Alaniz RC, Randel RD and Lawhon SD. 2016. *Salmonella* Typhimurium and multidirectional communication in the gut. *Front. Microbiol.* 7:1827.

Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A, Hardt WD, Hensel M. 2007. *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant nonfimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell. Microbiol.* 9:1834 –1850.

Gil V. 2007. Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. En: XX Reunion ALPA. Cusco: Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal.

Gillespie IA, O'Brien SJ, Adak GK, Ward LR, Smith HR. 2005. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks? *Epidemiology and Infection.* 133: 759–801.

Guamán M. 2014. Determinación del género y especie de *Salmonella* en cuyes mestizos en diferentes sistemas de crianza en la comunidad de Oñacapac del canton Saraguro. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista, Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana. 105p.

- Gulig PA, Curtiss R. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella* typhimurium. *Infect. Immun.* 55:2891–2901
- Gulig PA, Danbara H, Guiney DG, Lax AJ, Norel F, Rhen M. 1993. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* 7:825–830.
- Hacker J, Kaper JB. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641–679.
- Hall HK, Foster JW. 1996. The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 178:5683–5691.
- Hamid N, Jain SK. 2008. Characterization of an outer membrane protein of *Salmonella enterica* serovar typhimurium that confers protection against typhoid. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 15(9), 1461-71.
- Hanna LF, Matthews TD, Dinsdale EA, Hasty D, Edwards RA. 2012. Characterization of the ELPhiS prophage from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain LK5. *Appl Environ Microbiol.* 78(6):1785–93.
- Haneda T, Ishii Y, Danbara H, Okada N. 2009. Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* 297, 241–249.
- Hansen-Wester I, Hensel M. 2001. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* 3:549–559.
- Hapfelmeier S, Ehrbar K, Stecher B, Barthel M, Kremer M, Hardt WD. 2004. Role of the *Salmonella* pathogenicity island 1 effector proteins SipA, SopB, SopE, and SopE2 in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. *Infect. Immun.* 72:795–809

Hensel M, Nikolaus T, Egelseer C. 1999. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 31(2):489–498

Hensel M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*. 36:1015–23.

Hmiel SP, Snaveley MD, Florer JB, Maguire ME, Miller CGA. 1989. Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J. Bacteriol*. 171:4742-4751.

Holzer SU, Schlumberger MC, Jackel D, Hensel M. 2009. Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*, 77(12), 5458–5470

Hsiao W, Wan I, Jones SJ, Brinkman FSL. 2003. IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. *Bioinformatics*. 19:418–420.

Humaní K. 2009. Identificación de genes candidatos para la biosíntesis y degradación de glucosinolatos mediante herramientas bioinformáticas. Tesis para obtener el Título de Biólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

Hsueh-Hsia W, Yi-Yuan Y, Wen-Shyang H, Chi-Hsin L, Sy-Jye C, Leu, Mei-Ru C. 2009. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 68, Issue 6, 1, Pages 677–690.

Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. 8;11(1):119

Iijima OT, Saito M, Nakayama K, Kobayashi S, Matsuno K, Nakagawa M. 1987. Epizootiological studies of *salmonella*-typhimurium infection in guinea-pigs. *Experimental Animals*, Vol. 36, pp. 39-49.

INEI. Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2012. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Disponible en: <http://censos.inei.gob.pe/Cenagro/redatam/#>. [Accedido el 24 de Agosto 2018]

Ipinza F, Collao B, Monsalva D, Bustamante VH, Luraschi R, et al. 2014. Participation of the *Salmonella* OmpD Porin in the Infection of RAW264.7 Macrophages and BALB/c Mice. *PLOS ONE* 9(10): e111062.

Izumiya H, Sekizuka T, Nakaya H, Taguchi M, Oguchi A. 2011. Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623–630.

Jamshidi A, Kalidari G, Hedayati M. 2010. Isolation and identification of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from the eggs of retail stores in Mashhad, Iran using conventional culture method and multiplex PCR assay. *Journal of Food Safety* 30, 558–568.

Jarvik T, Smillie C, Groisman EA, Ochman H. 2010. Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar typhimurium 14028 genome. *J Bacteriol*, 192(2):560-7

Jennings E, Thurston TLM, Holden DW. 2017. *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences. *Cell Host Microbe* 22:217–231.

Jensen AN, Hoorfar J. 2000. Immediate differentiation of *Salmonella*-resembling colonies on brilliant green agar. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. 219–225, 2000.

Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T,

Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FS, Wright GD, McArthur AG. 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 45, D566-573.

Joensen KG, Scheutz F, Lund O et al. 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52(5), 1501–1510

Jong HK de, Parry CM, Poll T van der, Wiersinga WJ. 2012. Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog* 8(10):e1002933

Joys TM. 1985. The covalent structure of the phase-1 filament protein of *Salmonella* Typhimurium and its comparison with other flagellins. *J Biol Chem*, 260:15758–15761.

Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. 1990. Patología de los animales domésticos. 3ª ed. Montevideo: Agropecuaria hemisferio sur S.R.L. 160 p.

Juscamayta E. 2013. Análisis del genoma completo *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para la identificación de potenciales candidatos vacunales contra la neumonía aguda. Tesis para optar por el título de Biólogo Genetista y Biotecnólogo. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Kariuki S, Revathi G, Kariuki N, Kiiru J, Mwituria J, Hart CA. 2006. Characterisation of community acquired non-typhoidal *Salmonella* from bacteraemia and diarrhoeal infections in children admitted to hospital in Nairobi, Kenya. *BMC Microbiol.* 6:101.

Karlin S. 2001. Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. *Trends Microbiol.* 9(7), 335–343

Kaur J, Jain SK. 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*, Volume 167, Issue 4, Pages 199-210, ISSN 0944-5013.

- Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immune Int Rev Cytol*, 34:637–650.
- Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zähringer U, Brade H. 1998. A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. *Mol Microbiol* 29: 571–579.
- Kim JS, Eom JS, Jang JI, Kim HG, Seo DW, et al. 2011. Role of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 protein IacP in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenesis. *Infect Immun* 79: 1440–1450.
- Kingsley RA, Msefula CL, Thomson NR, Kariuki S, Holt KE, Gordon MA, Harris D, Clarke L, Whitehead S, Sangal V, Marsh K, Achtman M, Molyneux ME, Cormican M, Parkhill J, MacLennan CA, Heyderman RS, Dougan G. 2009. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella Typhimurium* causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome research*, 19(12), 2279-87.
- Kiss T, Morgan E, Nagy G. 2007. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* 275(1):153–159.
- Klumpp J, Fuchs TM. 2007. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella typhimurium* replication in macrophages. *Microbiology* 153, 1207–1220.
- Knodler LA, Celli J, Hardt WD, Vallance BA, Yip C, Finlay BB. 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* 43(5):1089–1103.
- Kolbe DL, Eddy S. 2011. Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics*, 27, 3102–3109.
- Kosarewicz A, Königsmaier L, Marlovits TC. 2012. The blueprint of the type-3 injectisome. *Philos. Trans. R. Soc, Lond. B Biol. Sci.* 367, 1140–1154

- Kozak GK, Macdonald D, Landry L, Farber JM. 2013. Foodborne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009. *J. Food Prot.* 76:173–183.
- Kuhle V, Hensel M. 2004. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol. Life Sci.* 61:2812–2826.
- Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Stærfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.*, 35(9), 3100–31008.
- Langille MGI, Hsiao WWL, Brinkman FSL. 2008. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:329.
- Łaniewski P, Baek C-H, Roland KL, Curtiss R, III. 2017. Analysis of spleen-induced fimbria production in recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *mBio* 8:e01189-17
- Laslett D, Canback B. 2004. Aragorn, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.*, 32, 11–16
- Layme A. 2010. Frecuencia de lesiones anatomopatológicas en Cobayos con diagnóstico bacteriológico de *Salmonella* sp. remitidos al Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la FMV-UNMSM durante el período 2001-2007. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Lee IS, Lin J, Hall HK, Bearson B, Foster JW. 1995. The stationary-phase sigma factor σ^S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 17: 155–167.
- Leon IM, Lawhon SD, Norman KN, Threadgill DS, Ohta N, Vinasco J, Scott HM. 2018. Serotype diversity and antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* isolates from patients at an equine referral hospital. *Appl Environ Microbiol* 84:e02829-17.

Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, He G. 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. *GigaScience* 1:18.

Luo Y, Kong Q, Yang J, Golden G, Wanda S-Y, Roderick VJ, Ernst PB, Curtiss RI. 2011. Complete genome sequence of the Universal Killer *Salmonella enterica* serovar Typhimurium UK-1 (ATCC 68169). *Journal of Bacteriology*, 193(15) p. 4035–4036

Luo Y, Kong Q, Yang J, Mitra A, Golden G, Wanda S-Y, Roland KL, Roderick VJ, Ernst PB, Curtiss RI. 2012. Comparative genome analysis of the high pathogenicity *Salmonella* Typhimurium strain UK-1. *PLoS ONE* 7(7): e40645.

Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstei M. 2001. What is Bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods of information in medicine*, 40(4), pp.346-358.

Magnet S, Courvalin P, Lambert T. 1999. Activation of the cryptic *aac(6')*-Iy aminoglycoside resistance gene of *Salmonella* by a chromosomal deletion generating a transcriptional fusion. *J Bacteriol* 181:6650-5.

Mahan MJ, Slauch JM, Mekalanos JJ. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259(5095), 686–688

Malorny B, Hauser E, Dieckmann R. 2011. New approaches in subspecies-level *Salmonella* classification. *Salmonella From Genome to Function*, S. Porwollik, Ed., pp. 1–23, Academic Press, Norfolk, UK

Marcelo G, 2015. Identificación de *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium aislada de cuyes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 66 p.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect.* 2:145–156.

Matsuura A, Morales S, Calle E, Ara M. 2010. Susceptibilidad a antibacterianos *in vitro* de *Salmonella enterica* aislada de cuyes de crianza familiar-comercial en la provincia de Carhuaz, Ancash. *Rev Inv Vet Perú* 21(1): 93-99.

Mattock E, Blocker A J. 2017. How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 64.

Mattos J, Palacios G, Glorio P, Morales S. 2013. Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) como aditivo no nutricional en la estimulación de *Lactobacillus* sp., y control de *Salmonella* Typhimurium en cuyes de carne. *Científica*. 10 (2): 123 – 134.

McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK. 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413:852– 856.

Meyer PN, Wilmes-Riesenberg MR, Stathopoulos C, Curtiss R. 1998. Virulence of a *Salmonella* Typhimurium OmpD Mutant. *Infect Immun* 66: 387–390

Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Moa DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. 2010. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*, 11:1136–1143.

MINAG. Ministerio de Agricultura y riego. 2008. Situación actual del Cuy. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-lasactividades-de-crianza-y-producci/300-cuyes>. [Accedido el 24 de Agosto 2018]

Mohammed M, Cormican M. 2015. Whole genome sequencing provides possible explanations for the difference in phage susceptibility among two *Salmonella* Typhimurium phage types (DT8 and DT30) associated with a single foodborne outbreak. *BMC Res. Notes*. 8, 728.

- Monack DM, Mueller A, Falkow S. 2004. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2:747–765
- Morales S. 2017. Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar - comercial en tres distritos de la Provincia de Bolognesi, Departamento de Ancash en época de seca. Tesis para optar el grado de Magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 80p.
- Morgan E, Campbell JD, Rowe SC, Bispham J, Stevens MP, Bowen AJ, Barrow PA, Maskell DJ, Wallis TS. 2004. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* 54(4):994–1010
- Nataro J, Bopp C, Fields P, Kaper J, Strockbine N. 2011. *Escherichia, Shigella, and Salmonella. Manual of Clinical Microbiology.* J. Versalovic, K. Carroll, G. Funke, J. Jorgensen, M. Landry, and D. Warnock, Eds., pp. 603–626, ASM Press, Washington, DC., USA, 10th edition, 2011.
- Negm RS, Pistole TG. 1998. Macrophages recognize and adhere to an OmpD-like protein of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 20: 191–199.
- Nieto PA, Pardo-Roa C, Salazar-Echegarai FJ, Tobar HE, Coronado-Arrázola I, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM. 2016. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes Infect* 18(5):302–309.
- Nishino K, Latifi T, Groisman EA. 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Mol. Microbiol.* 59, 126–141.
- Oelschlaeger TA, Hacker J. 2004. Impact of pathogenicity islands in bacterial diagnostics. *APMIS* 112(11–12), 930–936.
- Ohl ME, Miller SI. 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* 52:259 –274.

OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal. 2010. Salmonellosis. En: Manual of diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6° Ed. Francia: Office International des Epizooties.

Okoro CK, Kingsley RA, Connor TR, Harris SR, Parry CM, Al-Mashhadani MN, Kariuki S, Msefula CL. 2012. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature Genetics* 44, 1215–1221.

Orson N. 1972. The guinea pig. Departamento de Agricultura. National Agricultural Library USA. 73 p.

Paradiso R, Orsini M, Bolletti Censi S, Borriello G, Galiero G. 2016. Complete genome sequence of a *Myoviridae* bacteriophage infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Genome Announc* 4(5):e00940-16.

Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *MVZ-Córdoba* 7: 187-200.

Pérez-Toledo M, Martínez-Amador PA, Pastelin-Palacios R, Isibasi A, Cunningham AF, López-Macías C. 2016. La porina OmpD de *Salmonella* Typhimurium induce altos títulos de anticuerpos de larga duración: implicaciones en el desarrollo de vacunas contra la salmonelosis no tifoídica. *Gac Med Mex*. 152:5-13

Perna NT, Plunkett G3, Burland V et al. 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409(6819), 529–533

Pivnick H, Stuart PF, Walcroft M. 1966. Establishment of a salmonella-free guinea pig colony. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, vol. 30

Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. 2003. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann–White scheme. *Res Microbiol*. 154(3):173–174.

Pui CF, Wong WC, Chai LC, Nillian E, Ghazali FM, Cheah YK, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, Radu S. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*. 22:337–342.

Price-Carter M, Roy-Chowdhury P, Pope CE, Paine S, de Lisle GW, Collins DM, Nicol C, Carter PE. 2011. The evolution and distribution of phage ST160 within *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Epidemiol Infect* 139, 1262–1271.

Prouty AM, Van Velkinburgh JC, Gunn JS. 2002. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistance to bile: identification and characterization of the *tolQRA* Cluster. *J. Bacteriol*. 184:1270–1276.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ. 2002. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. ed. Zaragoza: ACRIBIA SA. 134 p.

Rabsch W, Voigt W, Reissbrodt R, Tsolis RM, Bäumlér AJ. 1999. *Salmonella* typhimurium IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. *J Bacteriol*. 181:3610-2.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. Tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, caprino y equino. 9° ed. Madrid: Mc Graw-Hill. 959p.

Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 635–700.

Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galin JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*. 6, 271-279

Ramírez VA. 1972. Estudio bacteriológico y epidemiológico de un brote infeccioso en cobayos. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 48 p.

Ramírez VA. 1976. Salmonelosis en cobayos. En: Primer curso de producción y sanidad en cuyes y conejos. Lima: Asociación de Médicos Veterinarios del Perú.

Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ 3rd. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol.* 27:313–320.

Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC. 2009. Characterization of MgtC, a virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *PLOS ONE* 4(5): e5551.

Saini S, Slauch JM, Aldridge PD, Rao CV. 2010. Role of cross talk in regulating the dynamic expression of the flagellar *Salmonella* pathogenicity island 1 and type 1 fimbrial genes. *J. Bacteriol.* 192:5767–5777.

Salipante SJ, Hall BG. 2003. Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. *Mol Biol Evol* 20:653-9.

Schmitt CK, Ikeda JS, Darnell SC, Watson PR, Bispham J, Wallis TS. 2001. Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect. Immun.* 69, 5619–5625.

Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 14, Pages 2068–2069.

Silva C, Betancor L, García C, Astocondor L, Hinojosa N, et al. 2017 Characterization of *Salmonella enterica* isolates causing bacteremia in Lima, Peru, using multiple typing methods. *PLOS ONE* 12(12): e0189946.

Simeone D, Aramburu H. 1967. Enzootia de cobayos (*Cavia cobaya*) debido a *Salmonella* Typhimurium. *Rev Med B. Aires* 48: 113-122.

Simpson JT, Wong K, Jackman SD, Schein JE, Jones SJM, Birol I. 2009. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. *Genome Research* 19:1117–1123.

Srinivasan VB, Vaidyanathan V, Mondal A, Rajamohan G. 2012. Role of the two component signal transduction system CpxAR in conferring cefepime and chloramphenicol resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One* 7, e33777.

Srividhya KV, Rao GV, Raghavenderan L, Mehta P, Prilusky J, Manicka S, Sussman JL, Krishnaswamy S. 2006. Database and comparative identification of prophages. In: Huang D-S, Li K and Irwin GW (eds). *Intelligent Control and Automation, Lecture Notes in Control and Information Sciences*. Springer, Berlin, Vol. 344, pp. 863–868.

Stellmacher W. 1981. Infecciones por *Salmonellas*. En: Beer J, eds. *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Ed. Zaragoza: ACRIBIA. p 59-81.

Stothard P, Wishart DS. 2005. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, 21:537-539

Swords WE, Cannon BM, Benjamin WH. 1997. Avirulence of LT2 strains of *Salmonella typhimurium* results from a defective *rpoS* gene. *Infect. Immun.* 65:2451–2453.

The UniProt Consortium. 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45: D158-D169

Timme RE, Pettengill JB, Allard MW, Strain E, Barrangou R, Wehnes C. 2013. Phylogenetic diversity of the enteric pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* inferred from genome-wide reference-free SNP characters. *Genome Biol. Evol.* 5: 2109-2123

Tindall BJ, Grimont PAD, Garrity GM, Euzéby JP. 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 55, no. 1, pp. 521–524, 2005

Toussaint A, Chandler M. 2012. Prokaryote genome fluidity: toward a system approach of the mobilome. *Methods Mol. Biol.* 804, 57–80

Tran Van Nhieu G, Ben-Ze'ev A, Sansonetti, PJ. 1997. Modulation of bacterial entry into epithelial cells by association between vinculin and the *Shigella* IpaA invasin. *The EMBO journal*, 16(10), 2717-29)

Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, Casadesu J, Platt DJ, Olsen JE. 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* 125, 229-255

Waack S, Keller O, Asper R, Brodag T, Damm C, Fricke WF, Surovcik K, Meinicke P, Merkl R. 2006. Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. *BMC Bioinformatics.* 2006; 7:142.

Wang W, Peng Z, Baloch Z, Hu Y, Xu J, Zhang W, Fanning S, Li F. 2017. Genomic characterization of an extensively-drug resistance *Salmonella enterica* serotype Indiana strain harboring bla_{NDM-1} gene isolated from a chicken carcass in China. *Microbiological Research*, Volume 204, p. 48-54, ISSN 0944-5013.

Wang S, Yang D, Wu X, Wang Y, Wang D, Tian M, Yu S. 2018. Autotransporter MisL of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium facilitates bacterial aggregation and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 365(17).

Watson PR, Benmore A, Khan SA, Jones PW, Maskell DJ, Wallis TS. 2000. Mutation of *waaN* reduces *Salmonella enterica* serovar Typhimurium induced enteritis and net secretion of type III secretion shing system 1-dependent proteins. *Infect Immun* 68: 3768–3771.

Wattiau P, Boland C, Bertrand S. 2011. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology.* 77:7877–7885.

- Weening EH, Barker JD, Laarakker MC, Humphries AD, Tsolis RM, Baumler AJ. 2005. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun.* 73:3358-3366
- Wiedemann A, Virlogeux-Payant I, Chaussé A-M, Schikora A, Velge P. 2014. Interactions of *Salmonella* with animals and plants. *Frontiers in microbiology*, 5:791.
- Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernandez-Mora M, Calva JJ, Silva C. 2009. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol*; 9:131
- Wilmes-Riesenberg MR, Bearson B, Foster JW, Curtiss III R. 1996. Role of acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 64:1085–1092.
- Wishart D, Arndt D, Pon A *et al.* 2015. T3DB: the toxic exposome database. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue), D928–D934
- Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. 1998. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella enteropathogenicity*. *Mol. Microbiol.* 29:883– 891.
- Yoon SH, Park YK, Lee S *et al.* 2007. Towards pathogenomics: a web-based resource for pathogenicity islands. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue), D395–D400
- Zerbino DR, Birney E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821–829.
- Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD, Slezak T. 2007. MvirDB – a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res.* 35(Database issue), D391–D394

Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS. 2011. PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, 39, W347–W352.

Zhu-Ge XK, Pan ZH, Tang F. 2015. The effects of *upaB* deletion and the double/triple deletion of *upaB*, *aatA*, and *aatB* genes on pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biot.* 99:10639-54.

10. ANEXOS

Anexo 1. Identificación de los factores de virulencia identificados en el genoma de *Salmonella Typhimurum* VET1 durante la búsqueda contra la base de datos VFDB. Se consideró un valor-e $\leq 1e-30$ y una identidad $> 90\%$.

BlastP VFDB										
Ubicación	ORF	Factor de Virulencia	GI	Valor-e	%ID	Longitud del alineamiento (aa)	Query		Subjet	
							start	end	start	end
Cromosoma	orf00004	SseK2 (TTSS-2 translocated effectors)	VFG020976	0	95.22	335	1	335	1	335
Cromosoma	orf00007	GogB (Gifsy-1 prophage leucine-rich repeat protein)	VFG004007	0	99.39	488	1	488	11	498
Cromosoma	orf00078	SinH (intimin-like protein)	VFG002307	0	100	730	1	730	1	730
Cromosoma	orf00082	RatB (putative outer membrane protein)	VFG002306	0	100	2435	1	2435	1	2435
Cromosoma	orf00083	ShdA (AIDA autotransporter-like protein)	VFG002305	0	99.72	725	12	736	1	725
Cromosoma	orf00088	SseL (deubiquitinase)	VFG020969	0	95	340	1	340	1	340
Cromosoma	orf00105	RcsB (DNA-binding capsular synthesis response regulator - <i>Klebsiella oxytoca</i>)	VFG049010	3E-152	98.15	216	1	216	1	216
Cromosoma	orf00122	IroB (glycosyl transferase)	VFG044146	0	100	371	1	371	1	371
Cromosoma	orf00123	IroC (ABC transporter protein)	VFG044147	0	100	1217	1	1217	1	1217
Cromosoma	orf00124	IroD (enterochelin esterase-like protein)	VFG044148	0	100	414	1	414	1	414
Cromosoma	orf00125	IroE (hydrolase)	VFG044149	0	100	311	1	311	1	311
Cromosoma	orf00126	IroN (outer membrane receptor)	VFG044150	0	99.86	724	1	724	1	724
SPI2	orf00129	PipB2 (type III secretion system effector)	VFG003997	0	100	350	1	350	1	350
Cromosoma	orf00132	Mig-14 (antimicrobial peptide resistance protein)	VFG002302	0	100	298	1	298	1	298
SPI1	orf00222	avrA (type III secretion system effector)	VFG000529	0	100	288	1	288	15	302
SPI1	orf00223	SprB (transcriptional regulator)	VFG000530	0	100	251	1	251	1	251
SPI1	orf00224	HilC (invasion regulatory protein)	VFG000531	0	100	295	1	295	1	295
SPI1	orf00225	OrgC (type III secretion system effector)	VFG003635	6E-108	100	150	1	150	1	150

SPI1	orf00226	OrgB (type III secretion system stator)	VFG000532	7E-170	100	226	1	226	1	226
SPI1	orf00227	OrgA (type III secretion system accessory cytosolic protein)	VFG003645	4E-138	100	192	1	192	8	199
SPI1	orf00228	PrgK (type III secretion system inner MS ring protein)	VFG000533	0	100	252	1	252	1	252
SPI1	orf00229	PrgJ (type III secretion system inner rod protein)	VFG000534	1E-67	100	101	1	101	1	101
SPI1	orf00230	PrgI (type III secretion system needle filament protein)	VFG000535	3E-53	100	80	1	80	1	80
SPI1	orf00231	PrgH (type III secretion system outer MS ring protein)	VFG000536	0	100	392	20	411	1	392
SPI1	orf00232	HilD (invasion protein regulatory protein)	VFG000537	0	100	309	1	309	1	309
SPI1	orf00233	HilA (invasion protein transcriptional activator)	VFG000538	0	100	553	1	553	1	553
SPI1	orf00234	lagB (invasion protein precursor)	VFG000539	6E-117	100	160	1	160	1	160
SPI1	orf00235	SptP (type III secretion system effector)	VFG000540	0	99.81	535	1	535	9	543
SPI1	orf00236	SicP (chaperone for SptP)	VFG000541	6E-90	99.23	130	1	130	1	130
SPI1	orf00238	lacP (acyl carrier protein)	VFG000542	1E-53	100	82	1	82	1	82
SPI1	orf00239	SipA/SspA (type III secretion system effector)	VFG000543	0	99.85	685	1	685	1	685
SPI1	orf00240	SipD (type III secretion system hydrophilic translocator)	VFG000544	0	100	343	1	343	1	343
SPI1	orf00241	SipC/SspC (type III secretion system hydrophilic translocator)	VFG000545	0	100	409	1	409	1	409
SPI1	orf00242	SipB/SspB (type III secretion system hydrophilic translocator)	VFG000546	0	100	593	1	593	1	593
SPI1	orf00243	SicA (chaperone for SipC and SipB)	VFG000547	5E-122	100	165	1	165	1	165
SPI1	orf00244	SpaS (type III secretion system export apparatus switch protein)	VFG000548	0	100	356	1	356	1	356

SPI1	orf00245	SpaR (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000549	0	100	263	1	263	1	263
SPI1	orf00246	SpaQ (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000550	2E-54	100	86	1	86	1	86
SPI1	orf00247	SpaP (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000551	6E-163	100	224	1	224	1	224
SPI1	orf00248	SpaO (type III secretion system C ring protein)	VFG000552	0	100	303	1	303	1	303
SPI1	orf00249	InvJ (type III secretion system needle length regulator)	VFG000553	0	100	336	1	336	1	336
SPI1	orf00250	InvI (type III secretion system stalk protein)	VFG000554	2E-97	99.32	147	1	147	1	147
SPI1	orf00251	InvC (type III secretion system ATPase)	VFG000555	0	100	431	1	431	1	431
SPI1	orf00252	InvB (type III secretion system protein)	VFG000556	2E-96	100	135	1	135	1	135
SPI1	orf00253	InvA (type III secretion system major export apparatus protein)	VFG000557	0	100	685	1	685	1	685
SPI1	orf00254	InvE (type III secretion system gatekeeper)	VFG000558	0	100	372	1	372	1	372
SPI1	orf00255	InvG (type III secretion system secretin)	VFG000559	0	100	562	1	562	1	562
Cromosoma	orf00258	InvH (type III secretion system pilotin)	VFG000561	8E-105	100	147	1	147	1	147
Cromosoma	orf00283	RpoS (sigma S (sigma 38) factor of RNA polymerase)	VFG000477	0	100	330	1	330	1	330
SPI2	orf00355	SopD2 (type III secretion system effector)	VFG042068	0	100	319	1	319	1	319
Cromosoma	orf00616	StbA (putative fimbrial major subunit)	VFG004255	5E-126	100	178	1	178	1	178
Cromosoma	orf00617	StbB (putative fimbrial chaperone)	VFG004250	0	100	253	1	253	1	253
Cromosoma	orf00618	StbC (putative fimbrial usher)	VFG004245	0	100	853	1	853	1	853
Cromosoma	orf00619	StbD (putative fimbrial usher)	VFG004240	0	100	441	1	441	1	441
Cromosoma	orf00620	StbE (putative fimbrial chaperone)	VFG004235	1E-138	99.48	194	1	194	59	252
Cromosoma	orf00632	KOX_00005 (protein disaggregation chaperone - Klebsiella oxytoca)	VFG049190	0	95.92	857	1	857	1	857

Cromosoma	orf00801	STM0570 (outer membrane esterase)	VFG042313	0	99.85	656	1	656	1	656
Cromosoma	orf00822	FepC (ferrienterobactin ABC transporter ATPase - Escherichia coli)	VFG000925	3E-180	92.4	263	1	263	1	263
Cromosoma	orf00825	EntS (enterobactin exporter - Escherichia coli)	VFG044165	0	90.71	409	1	409	1	409
Cromosoma	orf00923	Fur (transcriptional repressor of iron-responsive genes)	VFG000478	2E-108	100	150	1	150	1	150
Cromosoma	orf01067	FljA (phase-1 flagellin repressor)	VFG043070	4E-114	100	156	1	156	24	179
Cromosoma	orf01214	FljB (flagellin)	VFG043071	0	99.75	392	1	392	92	483
SPI1	orf01602	SlrP (type III secretion system effector)	VFG000469	0	100	765	1	765	1	765
SPI2	orf01649	SsaT (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000521	3E-84	100	125	1	125	1	125
SPI2	orf01650	SsaS (Tpe III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000520	1E-56	100	88	1	88	1	88
SPI2	orf01651	SsaR (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000519	8E-151	100	215	1	215	1	215
SPI2	orf01652	SsaQ (type III secretion system C ring protein)	VFG000518	0	100	322	1	322	1	322
SPI2	orf01653	SsaP (type III secretion system needle length regulator)	VFG000517	8E-90	100	124	1	124	1	124
SPI2	orf01654	SsaO (type III secretion system stalk protein)	VFG000516	3E-85	100	125	1	125	1	
SPI2	orf01655	SsaN (type III secretion system ATPase)	VFG000515	0	100	433	1	433	1	433
SPI2	orf01656	SsaV (type III secretion system major export apparatus protein)	VFG000514	0	100	681	1	681	1	681
SPI2	orf01657	SsaM (type III secretion system protein)	VFG000513	1E-87	100	122	1	122	1	122
SPI2	orf01658	SsaL (type III secretion system gatekeeper)	VFG000512	0	100	330	1	330	9	338
SPI2	orf01659	SsaK (type III secretion system stator)	VFG000511	2E-167	100	224	1	224	1	224

SPI2	orf01661	SsaJ (type III secretion system inner MS ring protein)	VFG000510	0	100	249	1	249	1	249
SPI2	orf01662	SsaI (type III secretion system inner rod protein)	VFG000509	8E-58	100	87	1	87	1	87
SPI2	orf01663	SsaH (type III secretion system protein)	VFG000508	3E-62	100	96	1	96	1	96
SPI2	orf01664	SsaG (type III secretion system needle filament protein)	VFG000507	2E-45	100	71	1	71	1	71
SPI2	orf01665	SseG (type III secretion system effector)	VFG000506	7E-170	100	229	1	229	1	229
SPI2	orf01666	SseF (type III secretion system effector)	VFG000505	0	100	260	1	260	1	260
SPI2	orf01667	SscB (chaperone for sseF)	VFG000504	2E-105	100	144	1	144	1	144
SPI2	orf01668	SseE (type III secretion system effector)	VFG000503	2E-97	100	138	1	138	1	138
SPI2	orf01669	SseD (type III secretion system hydrophilic translocator)	VFG000502	3E-138	100	195	1	195	1	195
SPI2	orf01670	SseC (type III secretion system hydrophilic translocator)	VFG000501	0	100	484	1	484	1	484
SPI2	orf01671	SscA (chaperone for sseC)	VFG000500	2E-115	100	157	1	157	1	157
SPI2	orf01672	SseB (type III secretion system effector)	VFG000499	3E-142	100	196	1	196	1	196
SPI2	orf01673	SseA (chaperone for sseB and sseD)	VFG000498	5E-75	100	108	1	108	1	108
Cromosoma	orf01729	LpfA (long polar fimbria protein)	VFG000456	3E-121	100	174	1	174	5	178
Cromosoma	orf01730	LpfB (long polar fimbrial chaperone protein)	VFG000455	3E-170	100	232	1	232	1	232
Cromosoma	orf01731	LpfC (long polar fimbrial usher protein)	VFG000454	0	100	842	1	842	1	842
Cromosoma	orf01732	LpfD (long polar fimbrial protein)	VFG000453	0	100	359	1	359	1	359
Cromosoma	orf01733	LpfE (long polar fimbrial minor subunit)	VFG000452	6E-128	100	175	1	174	1	175
Cromosoma	orf01847	FlhE (flagellar protein)	VFG043033	3E-91	100	130	1	130	1	130
Cromosoma	orf01848	FlhA (flagellar biosynthesis protein)	VFG043034	0	100	692	1	692	1	692
Cromosoma	orf01849	FlhB (flagellar biosynthesis protein)	VFG043035	0	100	383	1	383	1	383
Cromosoma	orf01850	CheZ (chemotaxis regulator)	VFG043036	4E-154	100	214	2	215	1	214
Cromosoma	orf01851	CheY (chemotaxis regulatory protein)	VFG043037	5E-89	100	129	1	129	1	129

Cromosoma	orf01852	CheB (chemotaxis-specific methylesterase)	VFG043038	0	100	349	1	349	1	349
Cromosoma	orf01853	CheR (chemotaxis methyltransferase)	VFG043039	0	100	288	1	288	1	288
Cromosoma	orf01854	Tar/CheM (methyl accepting chemotaxis protein II)	VFG043040	0	100	553	1	553	1	553
Cromosoma	orf01856	CheW (purine-binding chemotaxis protein)	VFG043041	3E-117	100	167	1	167	1	167
Cromosoma	orf01857	CheA (chemotaxis protein)	VFG043042	0	100	671	1	671	1	671
Cromosoma	orf01858	MotB (flagellar motor protein)	VFG043043	0	100	309	1	309	1	309
Cromosoma	orf01859	MotA (flagellar motor protein)	VFG043044	0	100	295	1	295	1	295
Cromosoma	orf01860	FlhC (transcriptional activator)	VFG043045	7E-142	100	192	1	192	1	192
Cromosoma	orf01861	FlhD (transcriptional activator)	VFG043046	2E-76	99.1	111	1	111	4	114
SPI2	orf01891	SsrB (transcriptional activator)	VFG000492	3E-156	100	212	1	212	1	212
SPI2	orf01892	SsrA (sensor kinase)	VFG000493	0	99.89	920	1	920	1	920
SPI2	orf01893	Spic/SsaB (type III secretion system protein)	VFG000494	2E-90	100	127	1	127	7	133
SPI2	orf01894	SsaC (type III secretion system secretin)	VFG000495	0	99.8	497	1	497	1	497
SPI2	orf01895	SsaD (type III secretion system outer MS ring protein)	VFG000496	0	99.75	403	1	403	1	403
SPI2	orf01896	SsaE (chaperone for sseB)	VFG000497	3E-51	100	80	1	80	1	80
SPI2	orf01944	Ssel/SrfH (type III secretion system effector)	VFG003971	0	99.69	322	1	322	1	322
Cromosoma	orf01962	OmpA (outer membrane protein A - Escherichia coli)	VFG043544	0	92.86	350	9	358	1	346
SPI2	orf01980	PipB (type III secretion system effector)	VFG000589	0	100	291	1	291	1	291
SPI	orf01982	SopB/SigD (type III secretion system effector)	VFG000465	0	100	561	1	561	1	561
Cromosoma	orf02034	CsgG (curli production assembly/transport protein)	VFG000462	0	100	277	1	277	1	277

Cromosoma	orf02035	CsgF (curli production assembly/transport protein)	VFG000461	8E-98	100	138	1	138	1	138
Cromosoma	orf02036	CsgE (curli production assembly/transport protein)	VFG000460	5E-94	100	131	1	131	1	131
Cromosoma	orf02037	CsgD (DNA-binding transcriptional regulator)	VFG004125	5E-161	100	216	1	216	1	216
Cromosoma	orf02038	CsgB (minor curlin subunit precursor)	VFG000457	4E-106	100	151	1	151	1	151
Cromosoma	orf02039	CsgA (curlin major subunit)	VFG000458	1E-103	100	151	1	151	1	151
Cromosoma	orf02040	CsgC (curli assembly protein)	VFG000459	1E-72	100	108	1	108	1	108
Cromosoma	orf02067	FlgN (FlgK/FlgL export chaperone)	VFG043019	5E-98	100	140	1	140	1	140
Cromosoma	orf02068	FlgM (anti-sigma28 factor)	VFG043020	1E-64	100	97	1	97	1	97
Cromosoma	orf02069	FlgA (flagellar basal body P-ring biosynthesis protein)	VFG043021	2E-158	100	219	1	219	1	219
Cromosoma	orf02070	FlgB (flagellar basal body rod protein)	VFG043022	5E-98	100	138	1	138	1	138
Cromosoma	orf02071	FlgC (flagellar basal body rod protein)	VFG043023	6E-93	100	134	1	134	1	134
Cromosoma	orf02072	FlgD (flagellar basal body rod modification protein)	VFG043024	4E-164	100	232	1	232	1	232
Cromosoma	orf02073	FlgE (flagellar hook protein)	VFG043025	0	100	403	1	403	1	403
Cromosoma	orf02074	FlgF (flagellar basal body rod protein)	VFG043026	0	99.6	251	1	251	1	251
Cromosoma	orf02075	FlgG (flagellar basal body rod protein)	VFG043027	0	100	260	1	260	1	260
Cromosoma	orf02076	FlgH (flagellar basal body L-ring protein)	VFG043028	1E-161	100	221	1	221	12	232
Cromosoma	orf02077	FlgI (flagellar basal body P-ring protein)	VFG043029	0	100	365	1	365	1	365
Cromosoma	orf02078	FlgJ (flagellar rod assembly protein/muramidase)	VFG043030	0	100	316	1	316	1	316
Cromosoma	orf02079	FlgK (flagellar hook-associated protein)	VFG043031	0	100	553	1	553	1	553
Cromosoma	orf02080	FlgL (flagellar hook-associated protein)	VFG043032	0	100	317	1	317	1	317
SPI2	orf02123	SifA (type III secretion system effector)	VFG000470	0	100	336	1	336	1	336
Cromosoma	orf02130	PhoQ (sensor kinase protein)	VFG000474	0	100	487	1	487	1	487
Cromosoma	orf02131	PhoP (response regulator)	VFG000475	8E-164	100	224	1	224	1	224

Cromosoma	orf02262	Flk (flagella biosynthesis regulator)	VFG043069	0	99.7	333	1	333	1	333
Cromosoma	orf02381	SodCI (Gifsy-2 prophage: superoxide dismutase precursor)	VFG000463	1E-125	100	177	1	177	1	177
Cromosoma	orf02457	StdA (putative fimbrial-like protein)	VFG004290	6E-140	100	194	1	194	1	194
Cromosoma	orf02458	StdB (putative outer membrane usher protein)	VFG004285	0	99.88	829	1	829	1	829
Cromosoma	orf02459	StdC (putative fimbrial chaparone)	VFG004280	0	100	247	1	247	1	247
Cromosoma	orf02460	StdD (outer membrane protein)	VFG042609	0	100	358	1	358	1	358
SPI2	orf02482	SteC (type III secretion system effector)	VFG042066	0	100	457	1	457	1	457
SPI2	orf02554	SseJ (type III secretion system effector)	VFG000471	0	100	408	1	408	1	408
SPI2	orf02584	SifB (type III secretion system effector)	VFG003988	0	100	316	1	316	1	316
SPI1	orf02602	SteA (type III secretion system effector)	VFG042067	3E-157	100	210	1	210	1	210
Cromosoma	orf02614	OmpD (outer membrane porin precursor)	VFG043568	0	100	362	1	362	1	362
Cromosoma	orf02721	StfG (putative minor fimbrial subunit)	VFG004334	4E-126	100	176	1	176	1	176
Cromosoma	orf02722	StfF (putative minor fimbrial subunit)	VFG004331	6E-114	100	158	1	158	1	158
Cromosoma	orf02723	StfE (putative minor fimbrial subunit)	VFG004328	3E-121	100	170	1	170	1	170
Cromosoma	orf02724	StfD (putative periplasmic fimbrial chaperone)	VFG004325	0	100	250	1	250	1	250
Cromosoma	orf02725	StfC (putative fimbrial outer membrane usher)	VFG004322	0	100	885	1	885	1	885
Cromosoma	orf02726	StfA (putative fimbrial subunit)	VFG004319	3E-131	100	186	1	186	1	186
Cromosoma	orf02748	StiA (putative fimbrial subunit)	VFG004376	9E-128	99.44	179	1	179	1	179
Cromosoma	orf02749	StiB (putative fimbrial chaparone)	VFG004374	6E-170	100	227	1	227	1	227
Cromosoma	orf02750	StiC (putative fimbrial usher)	VFG004372	0	100	848	1	848	1	848
Cromosoma	orf02751	StiH (putative fimbrial protein precursor)	VFG004370	0	100	359	1	359	1	359
SPI3	orf02823	MgtC (Mg ²⁺ transport protein)	VFG000575	1E-164	100	227	1	227	5	231
SPI3	orf02825	MgtB (Mg ²⁺ transport protein)	VFG000574	0	10	908	1	908	1	908
SPI3	orf02832	MisL (putative autotransporter)	VFG002304	0	100	955	1	955	1	955
SPI1	orf03024	SopE2 (type III secretion system effector)	VFG000467	2E-180	100	240	1	240	1	240

Cromosoma	orf03145	SpvD (hydrophilic protein)	VFG000437	2E-158	100	216	1	216	1	216
Cromosoma	orf03147	SpvC (type III secretion system effector)	VFG000438	0	100	241	1	241	1	241
Cromosoma	orf03149	SpvB (type III secretion system effector)	VFG000439	0	100	591	1	591	1	591
Cromosoma	orf03151	SpvA (outer membrane protein)	VFG000440	0	100	255	1	255	1	255
Cromosoma	orf03153	SpvR (Salmonella plasmid virulence: regulation of spv operon)	VFG000441	0	100	297	1	297	1	297
Cromosoma	orf03157	FimW (putative fimbrial protein)	VFG000451	4E-147	100	198	1	198	1	198
Cromosoma	orf03159	FimY (putative regulatory protein)	VFG000450	2E-176	100	240	1	240	1	240
Cromosoma	orf03160	FimZ (fimbrial protein Z)	VFG000449	6E-153	100	210	1	210	1	210
Cromosoma	orf03161	FimF (type I fimbriae adaptor protein)	VFG000448	7E-124	100	172	1	172	1	172
Cromosoma	orf03162	FimH (type I fimbriae minor fimbrial subunit)	VFG000447	0	100	335	1	335	1	335
Cromosoma	orf03163	FimD (usher protein)	VFG000446	0	100	870	1	870	1	870
Cromosoma	orf03164	FimC (chaperone protein)	VFG000445	9E-84	100	122	1	122	109	230
Cromosoma	orf03166	FimI (fimbrial protein internal segment)	VFG000444	7E-129	100	177	1	177	1	177
Cromosoma	orf03167	FimA	VFG021130	2E-130	98.92	185	1	185	1	185
Cromosoma	orf03187	AllB (allantoinase - Klebsiella pneumoniae)	VFG049120	0	93.16	453	1	453	1	453
Cromosoma	orf03237	AcrB (acriflavine resistance protein B - Klebsiella pneumoniae)	VFG049144	0	92.09	1049	1	1049	1	1049
Cromosoma	orf03431	Mig-5 (putative carbonic anhydrase)	VFG002301	0	100	246	1	246	1	246
Cromosoma	orf03525	FliC (flagellin)	VFG043051	0	97.48	357	29	385	123	472
Cromosoma	orf03527	FliD (flagellar capping protein)	VFG043052	0	100	467	1	467	1	467
Cromosoma	orf03528	FliS (flagellar protein)	VFG043053	4E-94	100	135	1	135	1	135
Cromosoma	orf03529	FliT (flagellar biosynthesis protein)	VFG043054	5E-83	100	122	1	122	1	122
Cromosoma	orf03535	FliE (flagellar hook-basal body protein)	VFG043055	2E-69	100	104	1	104	1	104
Cromosoma	orf03537	FliF (flagellar MS-ring protein)	VFG043056	0	99.82	560	1	560	1	560
Cromosoma	orf03538	FliG (flagellar motor switch protein G)	VFG043057	0	100	331	1	331	1	331
Cromosoma	orf03539	FliH (flagellar assembly protein H)	VFG043058	4E-170	100	235	1	235	1	235

Cromosoma	orf03540	FliI (flagellum-specific ATP synthase)	VFG043059	0	100	456	1	456	1	456
Cromosoma	orf03541	FliJ (flagellar biosynthesis chaperone)	VFG043060	7E-104	100	147	1	147	1	147
Cromosoma	orf03542	FliK (flagellar hook-length control protein)	VFG043061	0	100	405	1	405	1	405
Cromosoma	orf03543	FliL (flagellar basal body-associated protein)	VFG043062	7E-110	100	405	1	155	1	155
Cromosoma	orf03544	FliM (flagellar motor switch protein)	VFG043063	0	100	334	1	334	1	334
Cromosoma	orf03545	FliN (flagellar motor switch protein)	VFG043064	1E-94	100	137	1	137	1	137
Cromosoma	orf03546	FliO (flagellar biosynthesis protein)	VFG043065	2E-84	100	124	2	125	1	124
Cromosoma	orf03547	FliP (flagellar biosynthesis protein)	VFG043066	8E-171	100	245	1	245	1	245
Cromosoma	orf03548	FliQ (flagellar biosynthesis protein)	VFG043067	3E-56	100	89	1	89	1	89
Cromosoma	orf03549	FliR (flagellar biosynthesis protein)	VFG043068	0	100	264	1	264	1	264
SPI2	orf03615	SspH2 (type III secretion system effector)	VFG000468	0	94.76	764	7	730	25	788
Cromosoma	orf03671	GtrB (bactoprenol glucosyl transferase - Shigella flexneri)	VFG012939	0	90.2	306	1	306	1	306
Cromosoma	orf03677	ShdA (AIDA autotransporter-like protein)	VFG002305	0	100	1027	1	1027	1013	2039
SPI1	orf03783	SopA (type III secretion system effector)	VFG000464	0	100	782	1	782	1	782
Cromosoma	orf03798	Gnd (6-phosphogluconate dehydrogenase - Klebsiella pneumoniae)	VFG048830	0	95.09	468	1	468	1	468
Cromosoma	orf03815	GalF (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase subunit - Klebsiella pneumoniae)	VFG048990	0	92.54	295	1	295	3	297
SPI2	orf03856	SseK2 (type III secretion system effector)	VFG003982	0	100	335	1	335	14	348
Cromosoma	orf03869	StcD (putative outer membrane lipoprotein)	VFG004260	0	100	335	1	335	1	335
Cromosoma	orf03870	StcC (putative outer membrane protein)	VFG004265	0	99.88	829	1	829	1	829
Cromosoma	orf03871	StcB (putative periplasmic chaperone protein)	VFG004270	3E-165	100	227	1	227	1	227
Cromosoma	orf03872	StcA (putative fimbrial-like protein)	VFG004275	5E-127	100	176	1	176	1	176
Cromosoma	orf03983	Rck (resistance to complement killing)	VFG000442	4E-97	99.28	139	1	139	47	185

Cromosoma	orf03993	PefD (plasmid-encoded fimbriae chaperone protein)	VFG000433	2E-170	100	230	1	230	1	230
Cromosoma	orf03994	PefC (plasmid-encoded fimbriae usher protein)	VFG000434	0	100	802	1	802	1	802
Cromosoma	orf03995	PefA (plasmid-encoded fimbriae major subunit)	VFG000435	4E-120	100	172	1	172	1	172
Cromosoma	orf03996	PefB (plasmid-encoded fimbriae regulatory protein)	VFG000436	2E-69	100	100	1	100	1	100
Cromosoma	orf04029	FliB (lysine-N-methylase)	VFG043050	0	100	401	1	401	1	401
Cromosoma	orf04046	FliY (cystine transporter subunit)	VFG043047	0	100	266	1	266	1	266
Cromosoma	orf04047	FliZ (flagella biosynthesis protein)	VFG043048	2E-137	100	183	1	183	1	183
Cromosoma	orf04048	FliA (flagellar biosynthesis sigma factor)	VFG043049	8E-173	100	239	1	239	1	239
Cromosoma	orf04109	PagN (adhesin/invasin protein)	VFG043567	1E-175	100	239	1	239	1	239
Cromosoma	orf04114	SafD (putative fimbrial subunit)	VFG004205	1E-113	100	156	1	156	1	156
Cromosoma	orf04115	SafC (putative fimbrial usher)	VFG004200	0	100	836	1	836	1	836
Cromosoma	orf04116	SafB (putative fimbrial assembly chaperone)	VFG004195	2E-177	100	237	1	237	1	237
Cromosoma	orf04177	StjA (putative outer membrane protein)	VFG004378	3E-140	100	190	1	190	1	190
Cromosoma	orf04178	StjB (putative fimbrial usher protein)	VFG004379	0	100	802	1	802	1	802
Cromosoma	orf04179	StjC (putative fimbrial chaperone)	VFG004380	8E-171	100	235	1	235	1	235
Cromosoma	orf04180	STM4574 (putative outer membrane protein)	VFG004381	5E-162	100	229	1	229	1	229
Cromosoma	orf04181	STM4575 (putative outer membrane protein)	VFG004382	4E-163	100	229	1	229	1	229
Cromosoma	orf04200	SthE (putative major fimbrial subunit)	VFG004345	0	100	361	1	361	1	361
Cromosoma	orf04202	SthC (Outer membrane fimbrial usher protein)	VFG021623	0	99.88	845	1	845	1	845
Cromosoma	orf04203	SthB (putative fimbrial chaperone)	VFG004360	2E-167	100	227	1	227	1	227
Cromosoma	orf04204	SthA (putative fimbrial chaperone)	VFG004365	8E-130	100	181	1	181	1	181
Cromosoma	orf04230	BcfA (fimbrial subunit)	VFG004145	8E-126	100	180	1	180	1	180

Cromosoma	orf04231	BcfB (fimbrial chaparone)	VFG004150	2E-165	100	228	1	228	1	228
Cromosoma	orf04232	BcfC (fimbrial usher)	VFG004155	0	99.89	873	1	873	1	873
Cromosoma	orf04233	BcfD (fimbrial adhesin protein)	VFG004160	0	100	335	1	335	1	335
Cromosoma	orf04234	BcfE (fimbrial subunit)	VFG004165	3E-133	100	181	1	181	1	181
Cromosoma	orf04235	BcfF (fimbrial subunit)	VFG004170	6E-123	100	172	1	172	1	172
Cromosoma	orf04236	BcfG (fimbrial chaparone)	VFG004175	0	100	243	1	243	1	243
Cromosoma	orf04237	BcfH (thiol-disulfide isomerase)	VFG042608	0	100	281	1	281	1	281
SPI2	orf04542	SsaU (type III secretion system export apparatus switch protein)	VFG000522	0	100	352	1	352	1	352
SPI2	orf04543	SsaT (type III secretion system minor export apparatus protein)	VFG000521	3E-90	100	131	1	131	129	259
SPI4	orf04882	SiiE (inner membrane protein)	VFG000581	0	100	625	1	625	1424	2048