UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Caracterización de genomas completos de aislamientos de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de agua del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos mediante secuenciación de tercera generación

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación "Aplicación de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) en el análisis de contaminación microbiana en cuerpos hídricos y en la evaluación de patógenos de alta prioridad", aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0294-R, por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autor: María José Portero Regalado

Tutora: Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

Ambato - Ecuador

Enero - 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 08 de diciembre de 2025

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

1802142461

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, María José Portero Regalado, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

María José Portero Regalado

1851011054

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

María José Portero Regalado

1851011054

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
ESTEBAN MAURICIO FUENTES PEREZ
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA CERDA MEJIA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

1804148086

Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS
Validar únicamente con FirmaEC

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

Ambato, 19 de diciembre de 2025

DEDICATORIA

"Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas."
Romanos 11:36

Dedico esta tesis primeramente a Dios, quien ha sido mi fortaleza en la debilidad, mi esperanza en la incertidumbre y la fuente de la sabiduría que me ha sostenido durante todo este camino. A Él entrego este logro, reconociendo que sin su gracia nada de esto habría sido posible.

A mis papás, pilares de mi vida y principales promotores de mis sueños, gracias por su amor incondicional, por sus sacrificios silenciosos y por creer en mí aun cuando yo dudaba. Nada de lo que soy hoy sería posible sin su ejemplo, su esfuerzo y sus oraciones.

A mi hermana, mi ejemplo a seguir, gracias por inspirarme a ser mejor cada día, por demostrarme con tu vida que los sueños se alcanzan con disciplina, fe y perseverancia.

A mi Chochis, mi querida abuelita, por sus palabras llenas de cariño, sus oraciones y su forma tan especial de animarme a continuar. Gracias por recordarme siempre que sí puedo, que soy capaz y que Dios tiene planes grandes para mí.

A mi Tata, mi amado abuelito y ahora mi ángel en el cielo, te entrego esta tesis como una promesa cumplida que trasciende más allá de esta vida. Cada página lleva tu recuerdo y tu orgullo. Siempre estás en mi corazón y en cada meta alcanzada.

A mis docentes, en especial al Dr. William y a la Dra. Mirari, por compartir con generosidad sus conocimientos y por guiarme con paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos, quienes me acompañaron en este proceso con su apoyo, comprensión, paciencia y alegría. Gracias por las palabras de ánimo, las noches de estudio compartidas, los mensajes en los momentos difíciles y por celebrar conmigo cada pequeño avance.

A mí misma, por no decaer y no darte por vencida, por levantarte cada vez que sentiste que no podías más, por seguir adelante aun con miedo y cansancio. Este logro es también un recordatorio de que puedes alcanzar todo lo que te propongas cuando confías en Dios y en la persona que estás llegando a ser.

Finalmente, a las futuras generaciones: nunca dejen de soñar. Que este trabajo sea un testimonio de que, con fe en Dios, esfuerzo, constancia y un corazón dispuesto a aprender, cada sueño puede convertirse en realidad.

María José Portero Regalado

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la vida, la vitalidad y las fuerzas necesarias para llegar hasta este momento. Gracias por ser mi soporte, por guardarme en cada paso de este camino y por recordarme que *todo lo puedo en Cristo que me fortalece*. A Él encomiendo este logro, reconociendo que sin su voluntad nada de esto habría sido posible.

A mis padres, José y Lucy, quienes me han enseñado que cuando Dios está primero, los sueños se pueden alcanzar. Gracias por cada sacrificio, por sostenerme en los momentos de dificultad y por guiarme con amor desde mi primer día de vida. Gracias por enseñarme, con su ejemplo, a poner siempre el "pecho a las balas" y seguir adelante con valentía y fe. A mi hermana Sari, gracias por tu apoyo, por tu ejemplo en lo académico y profesional, y por demostrarme que con disciplina y esfuerzo se puede llegar lejos. Siempre tendrás mi admiración y cariño.

A mi abuelita, mi querida Chochis, gracias por confiar en mí, por tus palabras llenas de cariño y por tus oraciones que me acompañaron en este proceso. Tu ternura y tu orgullo por mí fueron una motivación constante para no rendirme. A mi Tatita, gracias por enseñarme que cuando las cosas se hacen con el corazón, eso se refleja en los resultados. Aunque hoy no estés físicamente a mi lado, sé que cada logro te hace sonreír desde el cielo; esta meta también es tuya.

A mis amigos, en especial a Kevin "Chui", gracias por estar en los buenos y malos momentos, por escucharme y por celebrar conmigo cada pequeño logro. A Justin, gracias por hacer más ligeros los días de estrés, por tu ayuda y por tu amistad desde nivelación.

Al Dr. William Calero, mi mentor, gracias por confiar en mí desde mis inicios. Gracias por abrirme puertas, por orientarme con paciencia, por exigirme dar lo mejor de mí y por ver potencial donde yo solo veía dudas. Su guía y confianza han sido fundamentales para la culminación de este trabajo. A mi equipo de UTA RAM, gracias por las enseñanzas, por la ayuda brindada y por abrirme las puertas del laboratorio. A todas las personas que, de una u otra forma, me brindaron una palabra de ánimo, una oración, un consejo o un gesto de apoyo, les expreso mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS xi
ÍNDICE DE FIGURAS xii
ÍNDICE DE ANEXOS xiii
RESUMEN EJECUTIVO xiv
ABSTRACT xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1 Antecedentes investigativos 1
1.1.1 Generalidades 1
1.1.2 Enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETA) 2
1.1.3 *Salmonella* spp. 3
1.1.4 Serovares de *Salmonella* spp. relevantes para la salud pública y el sector agrícola 5
1.1.5 Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* spp. 6
1.1.6 Presencia de *Salmonella* spp. en aguas superficiales de riego 8
1.1.7 Métodos de detección y caracterización 10
1.1.8 Evolución de las tecnologías de secuenciación 12
1.1.8.1 Principios de Oxford Nanopore 14
1.1.9 Análisis bioinformático en estudios genómicos 16

1.2 Objetivos 18
1.2.1 Objetivo General 18
1.2.2 Objetivos Específicos 18
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 19
2.1 Materiales 19
2.2 Métodos 23
2.2.1 Aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. en muestras de agua obtenidas en diferentes puntos del canal de riego Mocha–Quero–Ladrillos. 23
2.2.1.1 Recolección de muestras y aislamiento selectivo 23
2.2.1.2 Confirmación bioquímica 26
2.2.1.3 Evaluación del perfil antimicrobiano 27
2.2.2 Análisis de las secuencias del genoma completo de las cepas de *Salmonella spp.* aisladas mediante secuenciación de tercera generación. 28
2.2.2.1 Extracción y preparación del ADN genómico 28
2.2.2.2 Preparación de librerías y secuenciación 29
2.2.2.4 Análisis bioinformático 30
2.2.3 Evaluación de las relaciones filogenéticas entre los genomas completos obtenidos y secuencias de *Salmonella spp.* de distintos orígenes 31
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
3.1 Análisis y discusión de los resultados 33
3.1.1 Aislamiento y confirmación de cepas de *Salmonella* spp. a partir de muestras de agua del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos. 33
3.1.2 Análisis de las secuencias del genoma completo de las cepas de *Salmonella spp.* aisladas mediante secuenciación de tercera generación. 39
3.1.3 Evaluación de las relaciones filogenéticas entre los genomas completos obtenidos y secuencias de *S.* Typhimurium de distintos orígenes. 53
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 56
4.1 Conclusiones 56

4.2 Recomendaciones 58
MATERIALES DE REFERENCIA 59
Referencias Bibliográficas 59
ANEXOS 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados.... 19
Tabla 2 Ubicación geográfica de los puntos de muestreo..... 24
Tabla 3 Asignación de códigos de barras a cepas seleccionadas de Salmonella spp. durante el proceso de preparación de librerías. 29
Tabla 3 Asignación de códigos de barras a cepas seleccionadas de Salmonella spp. durante el proceso de preparación de librerías. 30
Tabla 4 Perfil metabólico de las cepas aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos..... 34
Tabla 5 Características genómicas y perfil antigénico de los aislamientos de Salmonella. 41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Factores y mecanismos que favorecen la persistencia de Salmonella en biopelículas. 10
Figura 2 Evolución de las tecnologías de secuenciación y su rendimiento en la producción de datos. 14
Figura 3 Representación esquemática del principio funcional de la secuenciación por nanoporos 16
Figura 4 *Mapa de calor del perfil fenotípico de resistencia a antibióticos β-lactámicos en los aislamientos de Salmonella spp.* 38
Figura 5 Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos 44
Figura 6 Distribución de genes de virulencia en cepas de S.Typhimurium según sus categorías funcionales 51
Figura 7 Árbol filogenético de aislamientos ecuatorianos de S.Typhimurium de distintos orígenes 54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas aisladas en cada punto muestreado del canal. 77

RESUMEN EJECUTIVO

La presencia del *Salmonella enterica* en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos representa un riesgo sanitario relevante, debido a que este recurso hídrico se utiliza en actividades agrícolas y puede actuar como vehículo para la transferencia de patógenos hacia alimentos de origen vegetal. La detección del microorganismo en distintos puntos del sistema reveló que este canal funciona como un reservorio capaz de favorecer la supervivencia y dispersión de este patógeno en ambientes no clínicos, lo que incrementa su potencial impacto sobre la inocuidad alimentaria y la salud pública. Para su caracterización, se aplicaron técnicas microbiológicas y verificación bioquímica, complementadas con secuenciación de tercera generación mediante Oxford Nanopore y *pipelines* bioinformáticos especializados, este enfoque permitió obtener ensamblajes genómicos completos e identificar regiones codificantes, elementos móviles, factores de virulencia y determinantes intrínsecos de resistencia, entre ellos una acetiltransferasa de aminoglucósidos que confiere resistencia a la tobramicina y kanamicina. La serotipificación *in silico* confirmó que todos los aislamientos corresponden al serovar *Salmonella* Typhimurium, mientras que los parámetros genómicos describieron su organización, variabilidad y grado de fragmentación. El análisis filogenético que integró 49 aislamientos de diferentes fuentes evidenció que las nueve cepas ambientales del canal poseen una estrecha relación evolutiva con sublinajes zoonóticos ST19 y ST1649 asociados a matrices de origen animal y alimentario en Ecuador. Estos hallazgos destacan que los genotipos presentes en el canal no corresponden a variantes exclusivamente acuáticas, sino a linajes que circulan entre múltiples nichos ecológicos.

Palabras clave: *Salmonella Typhimurium,* contaminación hídrica, Oxford Nanopore, canal de riego, sublinajes zoonóticos.

ABSTRACT

The presence of *Salmonella enterica* in the Mocha-Quero-Ladrillos irrigation canal represents a significant public health risk, as this water resource is used in agricultural activities and can serve as a vehicle for the transfer of pathogens to plant-based food products. The detection of the microorganism at multiple points along the system revealed that the canal functions as a reservoir capable of supporting the survival and dispersion of this pathogen in non-clinical environments, thereby increasing its potential impact on food safety and public health. To characterize the isolates, microbiological techniques and biochemical verification were applied, complemented by third-generation sequencing using Oxford Nanopore and specialized bioinformatic pipelines. This approach enabled the generation of complete genome assemblies and the identification of coding regions, mobile genetic elements, virulence factors, and intrinsic resistance determinants, including an aminoglycoside acetyltransferase conferring resistance to tobramycin and kanamycin. *In silico* serotyping confirmed that all isolates corresponded to the serovar *Salmonella* Typhimurium, while genomic parameters described their organization, variability, and degree of fragmentation. The phylogenetic analysis, integrating forty-nine isolates from different sources, demonstrated that the nine environmental strains from the canal exhibit a close evolutionary relationship with zoonotic sublineages ST19 and ST1649 associated with animal and food-related matrices in Ecuador. These findings indicate that the genotypes present in the canal are not exclusive aquatic variants but rather lineages circulating across multiple ecological niches.

Keywords: *Salmonella* Typhimurium, water contamination, Oxford Nanopore, irrigation canal, zoonotic sublineages.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Generalidades

Cada año, más de 550 millones de personas sufren enfermedades diarreicas transmitidas por el consumo de productos contaminados, siendo *Salmonella* spp. una de las principales causantes de estas infecciones a nivel mundial **(World Health Organization [WHO], 2018).** Este patógeno puede provocar enfermedades como gastroenteritis, fiebre tifoidea y septicemia. Algunos serotipos presentan resistencia a múltiples antimicrobianos, lo que agrava su impacto en la salud pública **(Peruzy et al., 2023).** Aunque se ha investigado ampliamente su presencia en el sector sanitario y alimentario, su detección ambiental plantea interrogantes sobre las fuentes de contaminación no controladas. En Ecuador, a diferencia de otros países sudamericanos, no se han reportado estudios sobre *Salmonella* en fuentes hídricas**,** lo que representa una brecha en la identificación de las potenciales rutas de diseminación de este patógeno en el país **(Reyes et al., 2025)**.

Tradicionalmente, el análisis de *Salmonella* spp. se ha basado en métodos de cultivo y en técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten una identificación rápida y específica del patógeno **(Calero-Cáceres et al., 2023).** Asimismo, la secuenciación de nueva generación (NGS) ha sido utilizada para el análisis de regiones genéticas específicas. Sin embargo, estas metodologías no siempre ofrecen una visión global del material genético bacteriano, limitando la comprensión de aspectos más complejos relacionados con su adaptación, patogenicidad y resistencia **(Awang et al., 2021)**. El desarrollo de herramientas genómicas, en particular la secuenciación del genoma completo (WGS), ha permitido superar estas limitaciones. Esta

estrategia posibilita una caracterización integral de los aislamientos, incluyendo la identificación de genes de resistencia antimicrobiana, factores de virulencia y relaciones filogenéticas **(Xu et al., 2023)**. Gracias a ello, es posible abordar con mayor precisión preguntas relacionadas con la diversidad genética, los reservorios ambientales y las posibles rutas de diseminación de *Salmonella* spp. en entornos agrícolas, aspectos que antes resultaban inaccesibles con enfoques tradicionales.

Frente a la problemática expuesta, en esta investigación se propone analizar genomas completos de cepas de *Salmonella* aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos, mediante secuenciación de tercera generación con tecnología Oxford Nanopore. Este enfoque permitirá identificar serotipos, genes de resistencia y relaciones filogenéticas con alta resolución que ayuden a comprender las relaciones genéticas entre cepas de distintos orígenes. La información generada contribuirá a comprender la diversidad genética de las cepas circulantes e identificar potenciales reservorios ambientales, fortaleciendo así la vigilancia microbiológica en sistemas agrícolas.

1.1.2 Enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETA)

Entre los microorganismos responsables de las enfermedades de origen alimentario, *Salmonella* spp. se destaca como uno de los agentes causales más frecuentes, por lo que es considerada como un patógeno prioritario por su elevada incidencia y la gravedad de los cuadros clínicos que puede llegar a ocasionar. La infección en humanos se presenta en dos formas: la salmonelosis no tifoidea (NTS) y la fiebre tifoidea. La NTS es la más común y se caracteriza generalmente por gastroenteritis aguda con diarrea, fiebre, dolor abdominal, vómitos y malestar general; en casos de niños y personas inmunocomprometidas puede progresar hacia infecciones invasivas como septicemia, meningitis o artritis séptica **(Wilairatana et al., 2021)**. Por otro lado, la fiebre tifoidea, producida por *S.* Typhi y *S.* Paratyph*i,* causa fiebre prolongada, cefalea, anorexia y en casos graves, perforación intestinal y shock séptico, lo que la convierte en una enfermedad potencialmente mortal si no se trata adecuadamente **(Manesh et al., 2021).**

A nivel global, se estima que en 2019 se registraron aproximadamente 73.9 millones de casos de enfermedades diarreicas por *Salmonella* no tifoidea, con 61.600 muertes. Mientras que la fiebre tifoidea afectó a cerca de 9 millones de personas y ocasionó unas 110.000 muertes **(WHO, 2019)**. En Ecuador, reportes oficiales muestran que entre el 2015 y 2020 se registraron 114.695 casos de ETA, con variaciones regionales importantes. En la Amazonía se presentaron las tasas más altas, alcanzando incidencias superiores a 180 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en la región Costa y Sierra la salmonelosis llegó a superar a la hepatitis A en varios años del periodo analizado **(Ochoa-Avilés et al., 2024)**.

Existen reportes de brotes asociados al consumo de vegetales frescos, lo que demuestra que los cultivos regados con agua contaminada pueden convertirse en reservorios críticos de *Salmonella.* Cuando se utiliza agua contaminada en la producción de hortalizas o frutas frescas, los patógenos llegan a transferirse de manera directa a los tejidos vegetales **(Kowalska, 2023).** El riego por aspersión incrementa la exposición, ya que las gotas de agua impactan directamente en hojas y frutos. Según **Grivokostopoulos et al. (2022),** los microorganismos como *Salmonella* no solo permanecen en la superficie de los vegetales, sino que pueden internalizarse a través de estomas, flores o microlesiones en los tallos. Este fenómeno dificulta la eliminación de los contaminantes en la etapa de postcosecha, puesto que los microorganismos quedan protegidos dentro de los tejidos **(Mkangara, 2023)**.

1.1.3 *Salmonella* spp.

Es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, con forma de bacilo Gram negativo, no esporulado y facultativamente anaerobio, por lo que tiene la capacidad de crecer en presencia de oxígeno o sobrevivir en su ausencia mediante rutas metabólicas alternas **(Shaji et al., 2023)**. El tamaño promedio de *Salmonella* es de aproximadamente 2-3 µm de largo por 0,4-0,6 µm de ancho, tiene una reacción oxidasa negativa, además de producir sulfuro de hidrógeno (H_2S), reducir nitratos a nitritos y fermentar azúcares como glucosa y manosa, pero no lactosa ni sacarosa, dichas características las diferencian

de otras enterobacterias **(Oludairo et al., 2022)**. Taxonómicamente, el género pertenece al filo Pseudomonadota, clase Gammaproteobacteria, orden Enterobacterales. Está conformada por dos especies reconocidas las cuales son *S. enterica* y *S. bongori* **(Chattaway et al., 2021).**

Otra característica morfológica relevante es su movilidad, ya que poseen flagelos perítricos. Dichas estructuras son orgánulos filamentosos que se encuentran distribuidos alrededor de toda la superficie celular permitiendo su desplazamiento en medios líquidos o semisólidos **(Nakamura & Minamino, 2024)**. Cada flagelo está formado por la proteína flagelina y un motor basal incrustado en la membrana, por lo que funciona como un nanomotor biológico. Esta motilidad le confiere al patógeno la capacidad de dirigirse hacia fuentes de nutrientes o alejarse de condiciones adversas mediante quimiotaxis **(Minamino & Kinoshita, 2023)**. Desde el punto de vista de la patogénesis, la flagelina puede ser reconocida por el sistema inmune mediante el receptor TLR5, lo que desencadena un mecanismo de respuesta; sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de regular la expresión de sus genes flagelares para equilibrar la movilidad con la evasión inmunológica **(Clasen et al., 2023).**

Esta bacteria cuenta con una membrana externa, que contiene lipopolisacárido (LPS) compuesto por tres regiones: el lípido A, el núcleo oligosacarídico y el antígeno O. Este componente mantiene la integridad de la célula y actúa como una barrera protectora frente a sustancia tóxicas, además de participar en la interacción con el hospedador **(Mikołajczyk et al., 2024)**. El lípido A funciona como una endotoxina que puede activar respuestas inflamatorias, mientras que la longitud y composición del antígeno O determinan la capacidad de la bacteria para evadir el sistema inmune. En un estudio realizado por **Sun et al. (2022),** demostraron que las cadenas largas del antígeno O aumentan la resistencia al complemento y favorecen la supervivencia *in vivo*. La bacteria también puede modificar químicamente su LPS en respuesta a factores ambientales como pH ácido, concentración de magnesio o presencia de péptidos antimicrobianos **(Heffernan et al., 2024).**

En cuanto a sus mecanismos de virulencia, *Salmonella* posee sistemas de secreción tipo III (T3SS) que actúan como "jeringas moleculares" para inyectar proteínas efectoras en células del hospedador, alterando el citoesqueleto y las rutas de señalización. Estos sistemas están codificados en islas de patogenicidad (SPIs) localizadas en el cromosoma bacteriano **(Hussain et al., 2021).**

1.1.4 Serovares de *Salmonella* spp. relevantes para la salud pública y el sector agrícola

El género *Salmonella* tiene una alta diversidad genética y antigénica, evidenciada por la existencia de más de 2.600 serovares reconocidos según el esquema de Kauffmann-White-Le Minor, en el cual se clasifica a las cepas en función de sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y en algunos casos capsulares (Vi) **(Oludairo et al., 2022).** Las variaciones serológicas no constituyen especies distintas, sino que confieren propiedades biológicas y epidemiológicas específicas. Cada serovar posee combinaciones únicas determinantes como los antígenos y factores de virulencia que influyen en su relación con los hospedadores, su persistencia ambiental y la gravedad del cuadro clínico que pueden causar **(Ahmad et al., 2022)**.

Los serovares que tienen una adaptación estricta al hospedador suelen producir infecciones sistémicas graves pero limitadas a una especie concreta. Por ejemplo, *S.* Typhi y *S.* Paratyphi son patógenos exclusivos del ser humano, mientras que *S.* Dublin está asociado a los animales como bovinos. En estos puede llegar a ocasionar septicemias, abortos en terneros y enfermedades invasivas en personas expuestas a productos lácteos contaminados **(Robi et al., 2024)**. Por otro lado, serovares como *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium o *S.* Infantis pueden tener varios hospedadores y son responsables de la mayoría de los casos de salmonelosis no tifoidea en humanos **(Montoro-Dasi et al., 2023)**. En las industrias avícolas, *S.* Enteritidis es el principal patógeno contaminante de huevos y productos derivados, debido a la capacidad que tiene para colonizar el oviducto de las gallinas y persistir dentro del huevo incluso tras la cocción o el lavado **(Shaji et al., 2023).**

El nivel de patogenicidad entre serovares radica principalmente en la composición y regulación de sus islas de patogenicidad (SPIs) y de los sistemas de secreción T3SS. Se considera que en serovares que son altamente invasivos, como *S.* Enteritidis y *S.* Typhimurium, estos sistemas se expresan de manera coordinada, lo que les permite atravesar el epitelio intestinal y sobrevivir dentro de macrófagos **(Worley, 2025)**. Mientras que en el caso de serovares predominantemente ambientales como *S.* Agona o *S.* Mbandaka poseen islas de patogenicidad incompletas o menos activas, lo que justifica su baja virulencia en mamíferos **(Reyes et al., 2025).** Algunos linajes han adquirido megaplásmidos conjugativos, como el pESI/pESI-like de *S.* Infantis, los cuales portan genes de resistencia antimicrobiana, tolerancia a biocidas y factores de persistencia, aumentando de esta manera su capacidad de supervivencia en la cadena alimentaria **(Jeong et al., 2025).**

En estudios globales se ha determinado que más de 400.000 aislamientos realizados entre 2004 y 2022, *S.* Enteritidis representó aproximadamente el 43,6 % de los casos confirmados; seguida de *S.* Typhimurium con 21,7 %, por lo que ambas se consolidan como las variantes dominantes en el mundo. En América Latina, la distribución de serovares mantiene patrones similares, aunque con una mayor diversidad asociada a los sistemas productivos **(Liao et al., 2024)**. Por ejemplo, en Brasil, *S.* Infantis se ha convertido en el serovar predominante en la industria avícola, con cepas portadoras del plásmido pESI. Mientras que en Perú se ha detectado linajes multirresistentes del mismo serovar en granjas y mataderos de pollos **(Reyes et al., 2025)**. Así también, en Ecuador, la epidemiología refleja la misma tendencia, ya que, en la cadena avícola, *S.* Infantis es dominante con una prevalencia de 41,4 % en granjas avícolas, 55,5 % en carcasas de pollo y 1,98 % en muestras humanas **(Mejía et al., 2020).**

1.1.5 Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* spp.

La resistencia antimicrobiana (RAM) representa una de las mayores amenazas en la salud pública a nivel mundial, ya que limita la eficacia de los medicamentos utilizados para tratar infecciones tanto en humanos como en animales. Este fenómeno se produce

cuando las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir al contacto con antibióticos, impidiendo su acción y manteniendo su capacidad de multiplicarse. La Organización Mundial de la Salud considera a *Salmonella* como un patógeno prioritario, puesto que causa millones de casos de ETA. Se estima que para el 2050 las muertes por RAM aumenten a 10 millones, provocando una pérdida económica de 100 billones de dólares **(Billah & Rahman, 2024).**

La aparición y propagación de la resistencia se debe principalmente al uso excesivo e inadecuado de antibióticos en medicina humana y en la producción animal. Por ejemplo, en la industria avícola se emplean constantemente antibióticos para promover el crecimiento o para tratar enfermedades, lo que genera una presión selectiva que favorece la supervivencia de cepas resistentes **(Tan et al., 2022)**. *Salmonella* presenta diversos mecanismos moleculares mediante los cuales genera resistencia, uno de los más frecuentes es la producción de enzimas capaces de inactivar el fármaco, como las β-lactamasas de espectro extendido (ESBL), responsables de hidrolizar antibióticos del tipo penicilina y cefalosporina **(Mohamedtahir, 2025)**. Otro mecanismo relevante corresponde a las mutaciones en genes que modifican los sitios diana del antibiótico, como *gyrA* y *parC*, lo que confiere resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas. Así también, esta bacteria puede reducir la entrada del medicamento a su interior mediante la expulsión por bombas de eflujo o por la alteración de la permeabilidad de la membrana externa **(Punchihewage-Don et al., 2024)**.

Sin embargo, la adquisición de resistencia no siempre es por mutaciones propias, también puede ser de tipo adquirida. Este fenómeno, conocido como transferencia horizontal de genes (THG), ocurre a través de fragmentos móviles de ADN como plásmidos, integrones o transposones **(Oladeinde et al., 2021).** La THG puede darse mediante tres mecanismos que incluyen la conjugación, transformación y transducción, estos permiten el intercambio de material genético entre bacterias filogenéticamente distintas **(Liu et al., 2022)**. En la conjugación, los genes de resistencia se transfieren a través de plásmidos conjugativos que establecen un puente citoplasmático entre la célula donadora y la receptora. En el caso de la transformación, algunas bacterias competentes son capaces de captar fragmentos de ADN libre presentes en su alrededor, especialmente

en aguas o sedimentos ricos en materia orgánica, para integrarlos a su genoma por recombinación homóloga **(Liu et al., 2023)**. Por último, la transducción es mediada principalmente por bacteriófagos, los cuales actúan como vectores que incorporan fragmentos de ADN de una bacteria infectada y los transfieren a otra **(Blakely, 2024).** Estudios realizados en canales de riego y aguas superficiales han reportado aislamientos con genes *bla*$_{CTX}$*, tetA, sul1* y *mcr-1,* lo que demuestra que la contaminación de fuentes hídricas por efluentes agrícolas o urbanos constituye una vía de transmisión relevante **(Toyting et al., 2024).**

1.1.6 Presencia de *Salmonella* spp. en aguas superficiales de riego

El agua destinada al riego agrícola constituye un factor determinante en la inocuidad de los productos frescos, ya que puede actuar como vehículo de transmisión de microorganismos patógenos. A diferencia de la contaminación química, cuya naturaleza es estática, la de origen microbiano implica agentes biológicos capaces de multiplicarse, dispersarse y persistir en diferentes ambientes **(Bell et al., 2021)**. Según estudios, aproximadamente un 5% de las muertes en países en desarrollo están relacionadas con enfermedades desencadenadas por la exposición a microorganismos entéricos **(Izah & Ogwu, 2025)**. Las principales fuentes de contaminación microbiana en aguas de riego incluyen la escorrentía de excretas animales tras precipitaciones, la descarga de aguas residuales domésticas e industriales sin tratar y el uso del estiércol mal compostado en terrenos cercanos **(Meradji et al., 2025)**.

Diversos microorganismos han sido identificados en aguas utilizadas para riego. Entre las bacterias de mayor relevancia destacan *Salmonella* spp., *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga y *Listeria monocytogenes* **(Sharma et al., 2020)**. Adicional a estos, se suman virus entéricos como norovirus y hepatitis A, además de protozoos parásitos como *Giardia* y *Cryptosporidium,* que incrementan la complejidad epidemiológica de la contaminación **(Meradji et al., 2025)**. En estudios recientes se ha determinado que la incidencia de *Salmonella* en aguas de riego varía según el tipo de fuente y la intensidad del uso agrícola de la zona. **Gu et al. (2021),** reportaron que la

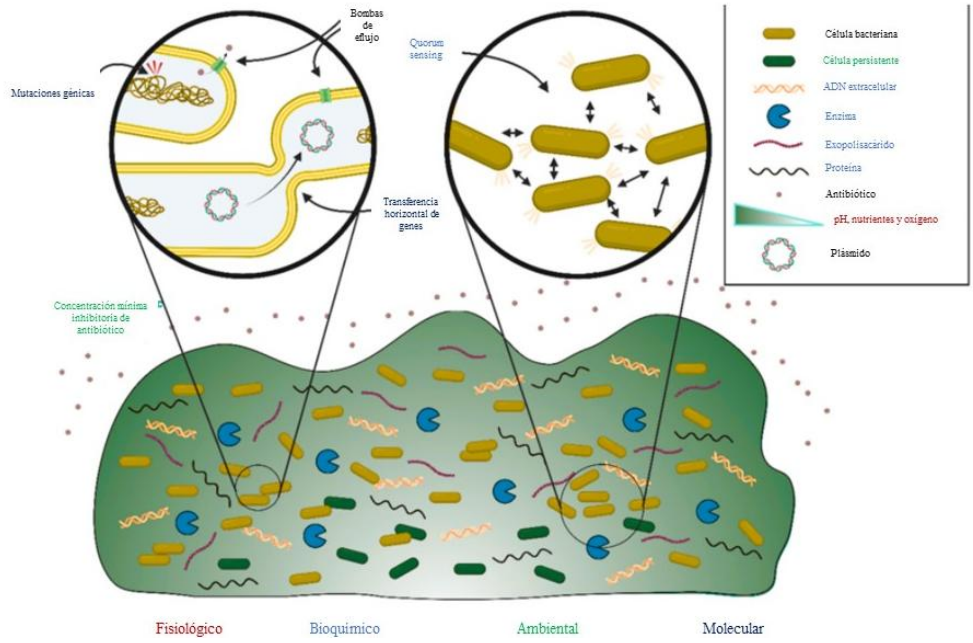
prevalencia de este patógeno es mayor en estanques de almacenamiento con un 20%, en comparación con pozos subterráneos donde se presenta en un 3%.

Dicho vínculo sugiere que la presencia de *Salmonella* suele acompañar a los indicadores de contaminación fecal tradicionales, aunque con diferente persistencia temporal. Esta relación no siempre se mantiene constante, ya que en pozos con recubrimientos impermeables o con baja infiltración el microorganismo puede mantenerse viable aun cuando otros indicadores desaparecen **(Onifade et al., 2025)**. La presencia de *Salmonella* está influenciada por factores como la temperatura del aire, la conductividad eléctrica, pH y el oxígeno disuelto **(Islam et al., 2021)**. Esta es una bacteria mesófila capaz de crecer en un rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 47 °C. En cuanto al pH puede tolerar valores entre 4,0 y 9,0, aunque su crecimiento es óptimo en condiciones neutras o ligeramente alcalinas **(Billah & Rahman, 2024).**

Un aspecto clave que también explica la prevalencia de *Salmonella* en aguas superficiales es su capacidad para adherirse a superficies y formar biopelículas. Estas son estructuras multicelulares que le permiten a los microorganismos persistir en ambientes acuáticos naturales, donde las células se organizan dentro de una matriz extracelular compuesta por polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y detritos celulares **(Harrell et al., 2021)**. Entre los principales componentes estructurales de la matriz se encuentran las fimbrias curli y la celulosa; estas proporcionan estabilidad mecánica y facilitan la adhesión. En el interior de las biopelículas se establecen gradientes de oxígeno, pH y nutrientes que favorecen la formación de células persistentes, las cuales pueden tener una resistencia alta a los antibióticos y desinfectantes en comparación con las células libres **(Liu et al., 2023).** Este efecto protector se debe tanto a la limitación en la penetración de los antimicrobianos por la matriz extracelular como a la sobreexpresión de bombas de eflujo MDR (Multidrug Resistance), que expulsan compuestos tóxicos del interior celular **(Aleksandrowicz et al., 2023)**. La interacción entre estos factores y su papel en la persistencia de la bacteria se muestran en la **Figura 1.**

Figura 1

Factores y mecanismos que favorecen la persistencia de *Salmonella* en biopelículas.



Nota. Principales mecanismos de resistencia en biopelículas de *Salmonella,* clasificados por el tipo de factor: fisiológico (rojo), bioquímicos (celeste), ambientales (verde) y moleculares (azul), que favorecen su supervivencia y persistencia en el entorno. Adaptado de **Aleksandrowicz et al. (2023).**

1.1.7 Métodos de detección y caracterización

La norma ISO 6579 establecida por la International Organization for Standardization (ISO) fundamenta el proceso para la detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en muestras de diferentes orígenes. Su desarrollo ha sido progresivo, ya que desde su primera publicación en 1981 hasta la última versión publicada en el año 2017 se han incorporado mejoras en los sistemas metodológicos **(Evangelopoulou et al., 2024).** Esta norma se sustenta en principios microbiológicos orientados a la recuperación de células dañadas y la identificación confirmatoria basada en criterios bioquímicos y serológicos **(International Organization for Standardization [ISO], 2017).** Según **Oludairo et al. (2022),** esta estructura considera la respuesta fisiológica del patógeno frente al estrés ambiental, por lo que incorpora una

fase inicial de preenriquecimiento en caldo peptonado tamponado que permite la reparación de células antes de su exposición a medios selectivos. Posteriormente, la norma hace relevancia en el uso de caldos como Rappaport-Vassiliadis (RV) o Müller-Kauffmann tetrationato-novobiocina (MkTTn) con la finalidad de favorecer la proliferación de *Salmonella* frente a otros organismos competidores, y la confirmación final se realiza mediante pruebas que verifican tanto las características metabólicas y antigénicas del género **(Lee et al., 2025)**.

A pesar de que estos métodos continúan siendo la base para la identificación de *Salmonella,* estudios mencionan que estos procedimientos requieren varias etapas secuenciales que pueden llegar a extender el tiempo de experimentación, lo que dificulta su aplicación en estudios de vigilancia ambiental o en matrices con baja carga bacteriana. Dichos procesos también pueden verse afectados por la presencia de bacterias en estado viable pero no cultivables **(Awang et al., 2021).** Es por esto que para su estudio también se han empleado métodos inmunológicos como la aglutinación, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para acortar los tiempos de respuesta, aunque su especificidad puede verse limitada por reacciones cruzadas con otros microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* **(Aruta et al., 2023).**

Otra de las técnicas que también es utilizada para el estudio de este patógeno es la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), la cual se ha posicionado como una herramienta de referencia por su alta sensibilidad y especificidad. En este se utiliza como marcador el gen *invA*, ya que es conservado dentro del género *Salmonella,* por lo que se emplea para la amplificación específica del ADN bacteriano **(Mohammed, 2022).** En un estudio realizado por **Awang et al. (2021)**, mencionan algunas variantes de esta técnica que permiten cuantificar copias génicas o detectar simultáneamente la presencia de genes de virulencia y resistencia, entre estas se menciona la PCR en tiempo real y la PCR múltiple. Sin embargo, a pesar de sus ventajas esta técnica requiere de reactivos específicos, además de que se puede obtener falsos negativos por una inhibición de la reacción debido a otros componentes presentes en matrices ambientales complejas; por esta razón, su aplicación se complementa con métodos de secuenciación genómica, que permiten caracterizar a las bacterias de manera precisa **(Williams et al., 2024).**

1.1.8 Evolución de las tecnologías de secuenciación

La historia de la secuenciación del ADN inicia a mediados del siglo XX, cuando Maxam-Gilbert y Sanger desarrollaron los pilares de la conocida primera generación de secuenciación. El método de Maxam-Gilbert, introducido en la década de 1970, se basaba en la degradación química del ADN mediante reactivos específicos para cada base nitrogenada. Dicho proceso requería el uso de radioisótopos, los cuales eran compuestos altamente tóxicos **(Hilt & Ferrieri, 2022).** En contraste, Frederick Sanger desarrolló el método de terminación de cadena, esta técnica se basaba en la incorporación selectiva de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia o radiactividad, los cuales interrumpían la síntesis del ADN en puntos específicos, generando fragmentos de longitudes variables que posteriormente eran separados a través de electroforesis capilar **(Annapureddy et al., 2024)**. La secuenciación de Sanger sentó las bases para el desarrollo de la genómica moderna; su aplicación fue de gran relevancia en el Proyecto del Genoma Humano. A pesar de su alta reproducibilidad, este tipo de secuenciación presentaba limitaciones relacionadas a su bajo rendimiento, alto costo y dependencia de equipos especializados **(Eren et al., 2023).**

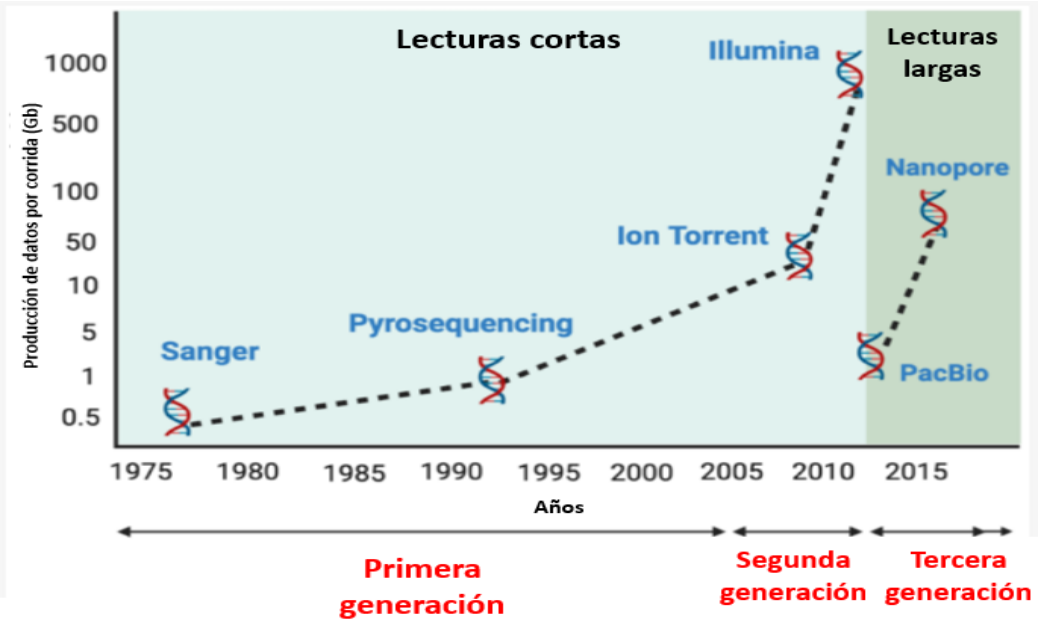
El desarrollo de la secuenciación de segunda generación (SGS) a mediados de la década del 2000 representó un cambio en el campo de la genómica al introducir la capacidad de generar millones de lecturas de manera simultánea en un solo ensayo. Plataformas como Illumina y 454 Roche incorporaron la amplificación clonal de fragmentos y la detección por fluorescencia en tiempo real, lo que aumentó de manera significativa la velocidad y el rendimiento del análisis genético **(Patwekar et al., 2025)**. Estas técnicas de secuenciación redujeron considerablemente los costos y facilitaron el acceso a la información genómica de múltiples organismos. Sin embargo, la SGS presentó lecturas de fragmentos cortos de ADN entre 100-300 pb, lo que dificultaba el ensamblaje de regiones repetitivas y la reconstrucción de plásmidos **(Satam et al., 2023)**.

Por otro lado, la secuenciación de tercera generación (TGS) surgió como respuesta a las limitaciones de las tecnologías previas, en esta se introdujo la capacidad de leer las moléculas de ADN de manera individual en tiempo real sin necesidad de etapas de amplificación. Según **Eren et al. (2023)**, este enfoque ha permitido obtener lecturas de gran longitud, superiores a 10.000 bases, lo que ha mejorado la continuidad de los ensamblajes genómicos y la detección de variaciones estructurales complejas. Dentro de esta categoría se incluyen plataformas como PacBio que aplica la secuenciación de molécula única en tiempo real (SMRT), en esta una polimerasa inmovilizada incorpora nucleótidos marcados por fluorescencia y Oxford Nanopore Technologies (ONT), la cual detecta los cambios en la conductancia eléctrica con el paso de las bases nitrogenadas por un nanoporo proteico **(Xu et al., 2020)**.

Las tecnologías de TGS han ampliado las posibilidades de análisis estructural y epigenético del ADN, al permitir la detección simultánea de modificaciones como la metilación y la identificación de plásmidos o elementos móviles **(Scarano et al., 2024)**. La transición entre generaciones y el incremento en la capacidad de producción de datos por corrida se muestra en la **Figura 2**, donde se evidencia el salto tecnológico que ha permitido pasar de lecturas cortas en la primera y segunda generación a lecturas largas en la tercera.

Figura 2

Evolución de las tecnologías de secuenciación y su rendimiento en la producción de datos.



Nota. El desarrollo de las tecnologías de secuenciación durante las últimas décadas se agrupa en tres generaciones: la primera, está representada por el método de Sanger; la segunda, por plataformas de lectura corta como Illumina e Ion Torrent; y la tercera, por tecnologías de lectura larga como PacBio y ONT. Adaptado de **Satam et al. (2023).**

1.1.8.1 Principios de Oxford Nanopore

La tecnología de secuenciación Oxford Nanopore Technologies (ONT) se constituye como uno de los avances más importantes dentro de la tercera generación de secuenciadores. El concepto inicial de utilizar nanoporos para la lectura de moléculas de ADN fue propuesto en la década de 1990; sin embargo, su desarrollo comercial se concretó en el 2014, con la introducción del dispositivo MinION. A diferencia de las tecnologías tradicionales, como Sanger o Illumina, Oxford Nanopore no requiere enzimas de replicación, amplificación por PCR, ni fluorescencia **(Lin et al., 2021)**.

Su funcionamiento se basa en un nanoporo artificial insertado en una membrana sintética, a través del cual circula una corriente eléctrica entre 100 pA y 100 mV. Este nanoporo se encuentra formado por la proteína α-hemolisina (αHL), de 33 kDa, obtenida

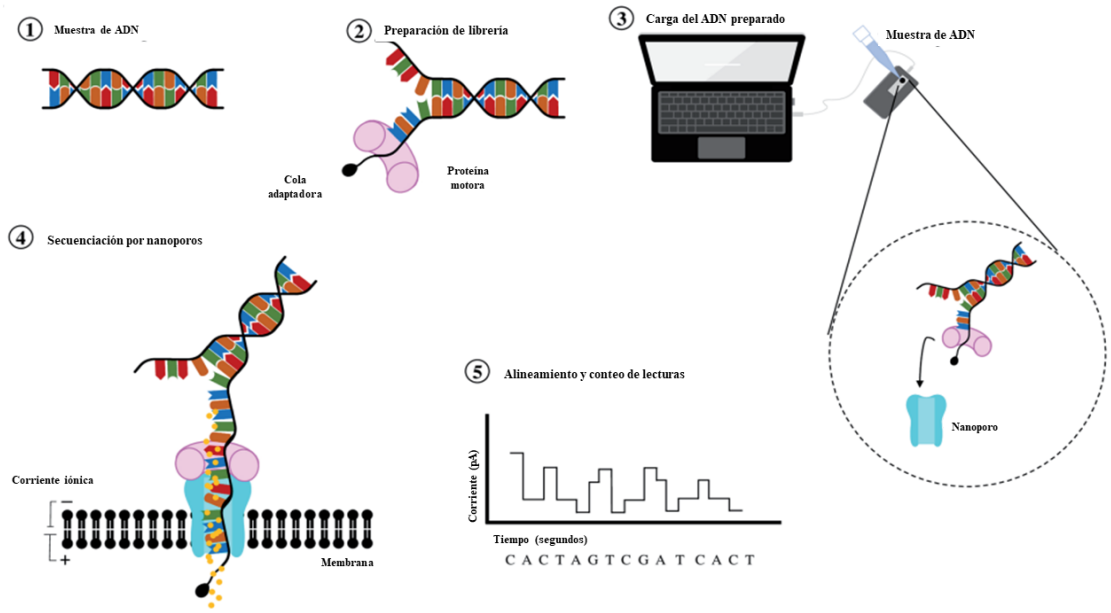
de *Staphylococcus aureus,* aunque también se han desarrollado variantes optimizadas para mejorar la sensibilidad **(Bhatti et al., 2021)**. Antes de iniciar la lectura, el ADN se prepara mediante la adición de un adaptador con una cola poli (A), cuya función es facilitar el reconocimiento de la molécula por el sistema de lectura y servir como punto de anclaje a una proteína motora. Esta proteína es encargada de transportar el ADN hacia el nanoporo y regular su movimiento, de modo que cada molécula pase por el canal de manera controlada a una velocidad constante **(Eren et al., 2023)**.

Una vez que el nanoporo reconoce el adaptador, la proteína motora desenrolla la doble hélice y conduce una sola hebra de ADN al interior del poro. Dado que el ADN tiene carga negativa, es atraído hacia el electrodo positivo, desplazándose a través de la membrana con el flujo de iones **(Lin et al., 2021)**. A medida que cada base nitrogenada se conduce por el poro, interfiere de manera diferente con la corriente iónica, desencadenando una leve variación en la intensidad del flujo eléctrico, todo el proceso se encuentra esquematizado en la **Figura 3**. Estas fluctuaciones conocidas como "picos de señal", son únicas para cada combinación de bases **(Eren et al., 2023)**. El sistema registra continuamente estas variaciones y las envía a un algoritmo de interpretación, el cual convierte los patrones eléctricos en secuencias digitales de nucleótidos. Este proceso conocido como basecalling, se realiza en tiempo real y permite visualizar la secuencia del ADN mediante archivos en formato .fastq **(Sheka et al., 2021)**.

El resultado de este proceso es una lectura de ADN de longitud ultra larga, capaz de superar los 100.000 pb en una sola molécula. Esta característica es crucial para reconstruir genomas completos sin fragmentación. Además, el mismo principio puede aplicarse a otros tipos de moléculas como ARN, proteínas, péptidos o polímeros sintéticos. Sin embargo, su tasa de error en la lectura cruda puede llegar a ser superior a la de las plataformas de lectura corta **(Zhao et al., 2023)**. Esto se debe a la complejidad del patrón eléctrico generado por grupos de bases consecutivas (K-mers), que pueden solaparse parcialmente. A pesar de ello, los avances en los modelos de basecalling y en los programas de corrección han permitido alcanzar precisiones superiores al 99% en los ensamblajes finales **(Xu et al., 2020).**

Figura 3

Representación esquemática del principio funcional de la secuenciación por nanoporos.



Nota. En la Figura se muestra el principio de funcionamiento de ONT, en donde el ADN atraviesa un nanoporo generando variaciones eléctricas que son convertidas en secuencias digitales. Adaptado de **Eren et al. (2023)**.

1.1.9 Análisis bioinformático en estudios genómicos

Posterior al proceso de secuenciación, los datos obtenidos son almacenados en archivos en formato .fastq, estos contienen la información de las secuencias junto con los valores de calidad asociados a cada lectura. A partir de estos datos se inicia el análisis bioinformático del genoma completo. Esta etapa resulta indispensable, puesto que permite transformar las lecturas crudas en información biológica interpretable **(Hong et al., 2024)**. Para iniciar con el análisis se lleva a cabo la evaluación de la calidad de las lecturas, dicho proceso permite eliminar fragmentos incompletos, lecturas de baja calidad, o posibles contaminantes. Luego, las lecturas válidas se someten al ensamblaje de *novo*, donde las secuencias se organizan y se unen para reconstruir la estructura completa del genoma bacteriano **(Sigova et al., 2023)**. Una vez obtenido dicho ensamblaje, se realiza la anotación genómica, con la finalidad de identificar genes,

regiones funcionales, plásmidos y elementos móviles que contribuyen a la comprensión de la composición genética y funcional del microorganismo **(Lamas et al., 2023)**.

Además de la reconstrucción del genoma, este análisis permite realizar la comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos internacionales, para establecer las relaciones filogenéticas y genéticas entre cepas. Dicho enfoque posibilita rastrear el origen de los aislamientos, analizar su evolución y detectar la presencia de genes asociados con virulencia o resistencia antimicrobiana **(Xu et al., 2020)**. En estudios realizados con el análisis del genoma de *Salmonella*, estas herramientas han permitido realizar tipificaciones mediante MLST y cgMLST, técnicas que agrupan los aislamientos de acuerdo con su perfil genético, facilitando el estudio de la diversidad bacteriana y su vigilancia epidemiológica **(Yan et al., 2021)**. La mayoría de estas herramientas se han desarrollado para usarse en Linux, sin embargo, para facilitar el trabajo se han creado plataformas de análisis web con un entorno intuitivo, gratuito y colaborativo como Galaxy **(Lamas et al., 2023)**.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Caracterizar genomas completos de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras de agua del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos mediante secuenciación de tercera generación.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar un aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. en muestras de agua obtenidas en diferentes puntos del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

- Analizar las secuencias del genoma completo de las cepas de *Salmonella* spp. obtenidas mediante secuenciación de tercera generación.

- Evaluar las relaciones filogenéticas entre los genomas completos obtenidos y secuencias de *Salmonella* spp. provenientes de aislamientos de distintos orígenes.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios de investigación la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Universidad Técnica de Ambato. En la **Tabla 1**, se enlistan los reactivos, material fungible y equipos que se utilizaron durante la investigación

Tabla 1

Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados.

EQUIPOS	CANTIDAD
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Microondas	1
Refrigeradora (4°C)	1
Congelador (-20°C)	1
Micropipeta de 0,5-10 μL	1
Micropipeta de 20-200 μL	1
Micropipeta de 100-1000 μL	1
Bomba de vacío	1
Vórtex	1
Termociclador	1
Centrífuga	1
Microcentrífuga	1
Qubit Fluorometer	1
Nanodrop	1
Termobloque	1
Dispositivo portátil de secuenciación de nanoporos MinION Mk1B	1
Celda de flujo MinION Mk1B	1

Continúa

Tabla 1

Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados.

EQUIPOS	CANTIDAD
Computadora	1
REACTIVOS	**CANTIDAD**
Agua estéril	5 L
Agua peptonada	500 g
Caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS)	7,8 g
Agar Xilosa-Lisina-Dexosicolato XLD	500 g
Caldo TSB (Trypto-Casein Soy Broth)	500 g
Agar MacConkey	500 g
Agar TSI (Triple Sugar Iron Agar)	27 g
Agar Citrato de Simmons	10 g
Agar base Urea	0,80 g
Urea	5 µL
Rojo de metilo	5 µL
Agar Mueller-Hinton	18,8 g
E.Z.N.A.® Soil DNA Kit	1 kit
Etanol 96%	1 L
Solución de trabajo HS dsDNA Qubit	4 mL
Perlas AMPure XP (AXP)	1000 µL
Muestra de control de ADN (DCS)	10 µL
Mezcla de reparación de ADN FFPE NEBNext®	8 µL
Módulo NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing	30 µL
Agua libre de Nucleasas (ddH_2O)	15 mL
Etanol 99,96%	10 mL
Kit de código de barras nativos (NB01-24)	1
EDTA	20 µL
Buffer de fragmentos Cortos (SFB)	20 µL

Continúa

Tabla 1

Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados.

REACTIVOS	CANTIDAD
Mezcla maestra de ligasa Blunt/TA NEB (NEB, M0367)	100 µL
Buffer de fragmentos Largos (LFB)	20 µL
Buffer de elución (EB)	20 µL
Adaptador Nativo (NA)	50 µL
Módulo de ligación rápida NEBNext® (NEB, E6056)	100 µL
Ligasa de ADN T4	50 µL
Flujo de enjuague de celda (FCF)	20 µL
Anclaje de celda de flujo (FCT)	300 µL
Solución de Biblioteca (LIS)	230 µL
Buffer de secuenciación (SB)	340 µL
MATERIAL FUNGIBLE	**CANTIDAD**
Botellas Ámbar (1 L)	20
Botellas de tapa azul (100 -500 mL)	15
Espátula	1
Asa de siembra	2
Cajas Petri plásticas	200
Pipeta de vidrio (10mL)	6
Pera de succión	1
Gradilla	3
Puntas para micropipetas	96 de cada tipo
Tubos de ensayo con tapa	30
Filtros de membrana de 0.45 µm	30
Tubos Falcon 50 mL	30
Eppendorfs de 1,5 mL y 200 µL	100
Tubos Eppendorf DNA LoBind de 1,5 mL	5
Tubos de PCR de 0,2 mL	10

Continúa

Tabla 1

Listado de equipos, material fungible y reactivos de laboratorio utilizados

MATERIAL FUNGIBLE	CANTIDAD
Tubos de ensayo Qubit	10
Mechero Bunsen	1
Kitasato	1
Pinzas	2
Parafilm	1
Guantes de nitrilo	2 cajas
Mascarillas	1 caja
Cofias	1
Cinta adhesiva de papel	1
Papel aluminio	1

Nota. Todos los equipos empleados fueron facilitados por el Laboratorio de Investigación de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE), enmarcado dentro del proyecto PFCIAL39.

2.2 Métodos

2.2.1 Aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. en muestras de agua obtenidas en diferentes puntos del canal de riego Mocha–Quero–Ladrillos.

2.2.1.1 Recolección de muestras y aislamiento selectivo

La metodología propuesta en la norma ISO 6579-2017 "Microbiología de la cadena alimentaria: método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de *Salmonella*" fue utilizada como base para el aislamiento selectivo de *Salmonella* spp. en muestras de agua, incorporando adaptaciones orientadas a optimizar la recuperación de bacterias viables en matrices ambientales con alta carga microbiana **(ISO, 2017)**. Se recolectaron 17 muestras en diferentes puntos geográficos del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos, como se muestra en la **Tabla 2,** dicho canal tiene una longitud de 21 kilómetros que abarca la parte suroccidental de la provincia de Tungurahua **(Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2024)**. En cada sitio se tomó aproximadamente 1000 mL de agua en frascos ámbar previamente esterilizados, los mismos se rotularon con fecha y código de muestreo. Las muestras se transportaron en refrigeración (2-8 °C) y se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a su recolección.

En condiciones asépticas, se flameó ligeramente el embudo porta-filtro tipo Kitasato y las pinzas. Se colocó una membrana de 0,45 µm y se procedió a la filtración con la bomba al vacío **(Calero-Cáceres et al., 2020)**. En muestras con mayor turbidez, se filtró entre 50-80 mL (hasta la saturación del filtro para garantizar suficiente biomasa); mientras que en muestras visiblemente más claras se filtró aproximadamente 100 mL. Luego, se enjuagó el sistema con 300 mL de agua estéril y 50 mL de etanol para arrastrar las células que se encontraban adheridas al vidrio y a la membrana. Con pinzas esterilizadas, se retiró el filtro y se depositó en un frasco estéril con 10 mL de agua peptonada, dichos frascos se llevaron a incubación overnight a 37°C para el

preenriquecimiento. Transcurrido este tiempo, se inoculó 0,1 mL en 9,9 de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) y se incubó a 42°C por 24 horas para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* frente a microorganismos competidores **(ISO, 2017)**.

Tabla 2

Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.

Código de cepa	Tipo de muestra	Ubicación geográfica	Coordenadas
S.A.1	Ambiental	Quero-Rumipamba	1° 24′ 46.63″ S 78° 38′ 23.12″ W
S.A.2	Ambiental	Quero-Rumipamba	1° 24' 38.07" S 78° 38' 12.76" W
S.A.3	Ambiental	Quero- Yanayacu	1° 24' 23.79" S 78° 36' 38.84" W
S.A.4	Ambiental	Quero- Yanayacu	1° 24' 4.67" S 78° 35' 40.45" W
S.A.5	Ambiental	Quero- Yanayacu	1° 23' 22.1" S 78° 35' 42.38" W
S.A.6	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 48.09" S 78° 34' 32.98" W
S.A.7	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 51.33" S 78° 32' 52.71" W
S.A.8	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 53.48" S 78° 32' 50.57" W
S.A.9	Ambiental	Quero – Rumipamba	1° 24' 58.77" S 78° 38' 36.86" W
S.A.10	Ambiental	Quero – Rumipamba	1° 24' 24.68" S 78° 37' 11.14" W
S.A.11	Ambiental	Quero – Yanayacu	1° 24' 4.74" S 78° 35' 55.49" W

Continúa

Tabla 2

Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.

Código de cepa	Tipo de muestra	Ubicación geográfica	Coordenadas
S.A.12	Ambiental	Quero- Yanayacu	1° 23' 33.6" S 78° 35' 32.72" W
S.A.13	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 49.16" S 78° 34' 33.66" W
S.A.14	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 45.33" S 78° 34' 31.92" W
S.A.15	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 21' 34.6" S 78° 33' 3.38" W
S.A.16	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 22' 10.16" S 78° 32' 48.49" W
S.A.17	Ambiental	Pelileo – Bolívar	1° 23' 6.63" S 78° 33' 15.8" W

Nota. Todas las muestras se recolectaron en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos durante el año 2025, abarcando distintos puntos de los cantones Quero y Pelileo.

Finalizado el enriquecimiento, se realizó la siembra por estría escocesa en agar XLD y las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. En este medio, las colonias sospechosas de ser *Salmonella* spp. se diferenciaron de otras enterobacterias por su incapacidad para fermentar lactosa y sacarosa, la producción de H_2S y la descarboxilación de lisina, lo que resultó en colonias rojas con centro negro **(Neyaz et al., 2024).** De cada placa positiva se seleccionó entre una y tres colonias con morfología típica, las cuales fueron resembradas en nuevas placas con XLD para obtener cultivos puros. Dichos cultivos se codificaron mantenido una trazabilidad (punto de muestreo, aislamiento y número de purificación) y se prepararon stocks de trabajo (Caldo TSB a 4 °C por corto plazo) y reserva criopreservada (Caldo TSB+ glicerol 20% a -70 °C) para etapas posteriores **(Siceloff et al., 2021).**

2.2.1.2 Confirmación bioquímica

Las colonias presuntas de ser *Salmonella* en el agar XLD fueron sujetas a confirmación bioquímica conforme a los lineamientos establecidos por la norma ISO 6579-2017 y el "Bacteriological Analytical Manual (BAM). Cada prueba fue incubada bajo condiciones estándar (37 °C overnight) **(Bastin et al., 2019)**. En primer lugar, se utilizó el medio TSI, el cual permite identificar la fermentación de carbohidratos y la producción de compuestos sulfhídricos (H_2S). Este medio cuenta con tres azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa, además de rojo fenol el cual sirve como indicador de pH y sales ferrosas. Su inoculación se realizó mediante una punción en la zona profunda del tubo seguida de una estría en la superficie inclinada del agar **(Andrews et al., 2024).**

Posteriormente, se realizó la prueba de Citrato de Simmons con la finalidad de determinar la capacidad de las cepas para utilizar el citrato como fuente de carbono. El medio fue inoculado con una estría sobre la superficie inclinada y una picadura superficial. Para evaluar la actividad ureasa se empleó un medio que contiene urea como sustrato e indicadores sensibles a variaciones de pH. En este caso, el medio fue distribuido en tubos Eppendorf estériles y cada uno se inoculó mediante una punción directa en el centro del sustrato **(ISO, 2017).**

De manera complementaria, se aplicó la prueba de Rojo de Metilo (MR) con el fin de identificar la producción estable de ácidos provenientes del metabolismo de glucosa **(Nissa et al., 2025)**. Para ello, las colonias fueron previamente incubadas en agua peptonada durante 24 horas, y posteriormente se adicionó el reactivo de rojo de metilo. Finalmente, se llevó a cabo la prueba de catalasa para determinar la capacidad de los aislamientos para descomponer el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Para esto se colocó una colonia sobre un portaobjetos limpio y se añadió peróxido de hidrogeno al 3%; la reacción enzimática se observó de manera inmediata.

Las cepas que presentaron el patrón bioquímico característico: TSI (A/K, H_2S +), Citrato (+), Ureasa (-), Rojo de Metilo (+), Catalasa (+), fueron confirmadas como pertenecientes al género *Salmonella* **(Andrews et al., 2024)**.

2.2.1.3 Evaluación del perfil antimicrobiano

Posteriormente, las cepas confirmadas fueron sometidas a la evaluación del perfil de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer, siguiendo el proceso establecido por **Hardiati et al. (2022)**. Las colonias frescas cultivadas en agar XLD fueron transferidas a caldo TSB hasta obtener una turbidez equivalente al estándar de McFarland 0,5 correspondiente a una concentración aproximada de 1,5 x 10^8 UFC/mL.

La suspensión bacteriana se inoculó de manera uniforme sobre la superficie de las placas de agar Muller-Hinton utilizando hisopos de algodón estériles, asegurando una distribución homogénea. Las placas se dejaron secar durante 10 minutos antes de colocar los discos de antibióticos con pinzas estériles. Se utilizaron cinco discos por placa, manteniendo una distancia de 3 cm entre discos para evitar la superposición de los halos de inhibición. Los antibióticos evaluados fueron cefotaxima (CTX), cefepima (FEP), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), aztreonam (ATM) y ceftriaxona (CRO), una vez colocados los discos las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se midieron los diámetros (mm), para la interpretación según los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute **(CLSI, 2024)**.

Tanto las pruebas bioquímicas como el antibiograma se aplicaron como filtros de confirmación y cribado, permitiendo seleccionar las cepas con mayor viabilidad y representatividad fenotípica. A partir de estos análisis se seleccionaron nueve cepas confirmadas de *Salmonella* spp.

2.2.2 Análisis de las secuencias del genoma completo de las cepas de *Salmonella spp.* aisladas mediante secuenciación de tercera generación.

2.2.2.1 Extracción y preparación del ADN genómico

Una vez seleccionadas las cepas, de cada una se seleccionó entre una o dos colonias bien aisladas de las placas de agar XLD para la obtención de la biomasa bacteriana. Las colonias se inocularon en tubos que contenían 10 mL de caldo TSB y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit E.Z.N.A.® Soil DNA Kit, siguiendo el protocolo del fabricante. El procedimiento constó de cinco etapas principales: lisis celular, eliminación de inhibidores, unión del ADN a la matriz de sílica, lavado y elución. En la fase de lisis, se transfirió 1 mL del cultivo líquido a un tubo Disruptor que contenía 725 µL de SLX-Mlus Buffer, al que posteriormente se añadió el DS Buffer, favoreciendo la ruptura de la pared celular y la liberación del ADN. En la etapa de remoción de inhibidores, se incorporó el P2 Buffer y el HRC Reagent, que permitieron precipitar compuestos interferentes y residuos del medio de cultivo. En la fase de binding, el ADN se unió selectivamente a la matriz de sílica, junto al XP1 Buffer, mientras que en los pasos de lavado se aplicó el HBC Buffer y el DNA Wash Buffer para eliminar proteínas y sales residuales. Finalmente, el ADN fue eludido utilizando 100 µL de Elution Buffer previamente calentado a 70°C, y se almacenó -20°C **(Omega Biotek, 2025)**. La pureza y concentración del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotometría Nanodrop considerando las relaciones A260/A280 (≥1,8) **y** A260/A230 (≥ 2) y fluorometría Qubit **(Fu et al., 2022)**.

2.2.2.2 Preparación de librerías y secuenciación

La preparación de librerías genómicas se realizó con el kit *Native Barcoding Kit* 24V14 (SQK-NBD114.24), el cual fue diseñado para la secuenciación del ADN genómico sin amplificación por PCR. El proceso constó de tres etapas principales: reparación y preparación de extremos, ligación del código de barras y adaptadores, y la purificación de fragmentos, estas fueron realizadas conforme a las especificaciones del fabricante **(Calero-Cáceres et al., 2020).**

Durante la etapa de reparación de extremos, el ADN fue tratado con los módulos NEBNext FFPE DNA Repair Mix **y** NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing, con la finalidad de asegurar extremos compatibles para la ligación. Posteriormente, se seleccionó el código de barras (*barcode*) para cada cepa como se observa en la **Tabla 3** y se realizó la ligación del mismo utilizando NEB Blunt/TA Ligase Master Mix, y la unión de adaptadores (Adapter Mix II y Quick T4 DNA Ligase), seguida de los pasos de purificación con las perlas magnéticas AMPure XP y los buffers SFB y LFB, dependiendo el tamaño de los fragmentos. Las librerías individuales se cuantificaron usando el Qubit dsDNA HS Assay y se normalizaron para obtener una carga final aproximada de 35-30 fmol **(Fu et al., 2022)**. Luego, las muestras con los códigos de barras se agruparon y se preparó una mezcla final de secuenciación con Loading Beads y Sequencing Buffer **(Oxford Nanopore Technologies, 2024)**.

Tabla 3

Asignación de códigos de barras a cepas seleccionadas de Salmonella spp. *durante el proceso de preparación de librerías.*

Cepas de Salmonella	Código de barras seleccionado
S.A.2.6	NB-05
S.A.12.3	NB-06
S.A.6.4	NB-07

Continúa

Tabla 4

Asignación de códigos de barras a cepas seleccionadas de Salmonella spp. *durante el proceso de preparación de librerías.*

Cepas de Salmonella	Código de barras seleccionado
S.A.5.1	NB-08
S.A.2.2	NB-09
S.A.4.3	NB-10
S.A.7.4	NB-11
S.A.3.2	NB-12
S.A.13.1	NB-13

Nota. Cada barcode (NB05-NB13) corresponde a una muestra individual identificada fenotípicamente como cepa de *Salmonella* spp.

La corrida de secuenciación se llevó a cabo con el dispositivo MinION Mk1B utilizando un Flow cell R10.4.1. El proceso se ejecutó por 16 horas mediante el software MinKNOW, el cual permitió la adquisición de señales eléctricas y la conversión de las mismas secuencias de nucleótidos (*basecalling*) con el modelo FAST. Este modelo permitió que los archivos generados en formato .pod5 fueran convertidos a .fastq **(Xu et al., 2020)**.

2.2.2.4 Análisis bioinformático

Este análisis se realizó en el entorno Linux, empleando herramientas de la biblioteca Bioconda. Inicialmente, se llevó a cabo el demultiplexado y la organización de los archivos en formato .fastq, los cuales fueron clasificados en función de sus barcodes. Cada código se colocó en un archivo único. Posteriormente, se realizó el ensamblaje de *novo* mediante la herramienta Flye, disponible en Galaxy, la cual es una plataforma que cuenta con múltiples herramientas bioinformáticas de libre acceso, estas permiten ejecutar análisis genómicos de forma reproducible **(Abueg et al., 2024)**. La herramienta Flye está diseñada para ensamblar lecturas largas, generando secuencias continuas en

formato FASTA, mediante un algoritmo basado en grafos de repetición **(Lamas et al., 2023).**

Las secuencias ensambladas fueron sometidas a análisis utilizando las herramientas del Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC). Esta herramienta permitió identificar las características genómicas, la predicción de genes, anotaciones basadas en familias de proteínas, búsqueda de elementos móviles y perfiles funcionales del organismo **(Olson et al., 2023)**. Para la detección de genes de resistencia antimicrobiana y elementos replicativos, se utilizaron las herramientas ResFinder y PlasmidFinder respectivamente, estas se encuentran en la plataforma del Center for Genomic Epidemiology (CGE) **(Aytan-Aktug et al., 2022**; **Florensa et al., 2022)**. Asimismo, para la identificación de factores de virulencia se utilizó VirulenceFinder, una herramienta desarrollada por la FDA, esta comparó las secuencias de las cepas con bases de datos mediante algoritmos de alineamiento tipo BLAST **(Han et al., 2024)**.

Para la representación visual del genoma ensamblado se utilizó la plataforma Proksee. En este entorno se integraron diferentes módulos analíticos que permitieron construir un mapa circular. Entre las principales herramientas se incluyó CARD RGI, el cual permitió la anotación de genes de resistencia; Prokka, para la anotación funcional y estructural del genoma, y los módulos de análisis de contenido G+C para identificar variaciones en la composición nucleotídica y posibles regiones de interés dentro del genoma **(Grant et al., 2023)**.

2.2.3 Evaluación de las relaciones filogenéticas entre los genomas completos obtenidos y secuencias de *Salmonella spp.* de distintos orígenes

Se realizó una búsqueda de secuencias genómicas de *S.* Typhimurium en la base de datos EnteroBase, aplicando un filtro específico para aislamientos con origen en Ecuador. Las secuencias seleccionadas se descargaron en formato FASTA y posteriormente se cargaron en la plataforma CSIPhylogeny del Center for Genomic Epidemiology, donde se efectuó la tipificación multilocus de genoma completo y la

inferencia filogenética basada en polimorfismos de nucleótido único (SNPs) para todos los aislamientos, utilizando los parámetros por defecto para *Salmonella enterica* **(Kaas et al., 2014).** El análisis generó un árbol filogenético en formato Newick, el cual fue importado a la plataforma Interactive Tree Of Life (iTOL), donde se editó e integró información de metadatos epidemiológicos y genómicos de los aislamientos **(Letunic & Bork, 2024)**.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

El desarrollo de la presente investigación permitió identificar la presencia de *Salmonella* en entornos acuáticos en el Ecuador, específicamente en el canal Mocha-Quero-Ladrillos. Además, la caracterización genómica mediante tecnología de tercera generación permitió realizar un estudio descriptivo completo de estos aislamientos, así como un análisis comparativo detallado, enfocado principalmente en describir la organización del genoma, los determinantes de resistencia antimicrobiana y los efectores de virulencia presentes en los aislamientos. Así también, se evaluó su relación evolutiva con cepas procedentes de diferentes orígenes, integrando herramientas bioinformáticas especializadas. A continuación, se presentan los resultados considerando los aspectos microbiológicos, genéticos y evolutivos que caracterizan a los aislamientos estudiados.

3.1.1 Aislamiento y confirmación de cepas de *Salmonella* spp. a partir de muestras de agua del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

En la investigación, se analizaron 17 muestras de agua recolectadas en diferentes puntos del canal de riego, de las cuales ocho (equivalentes al 47%), fueron positivas para la presencia de *Salmonella* spp., como se observa en la **Tabla 4.** En un estudio realizado en diferentes sistemas acuáticos empleados para riego, se detectó que el agua utilizada puede alcanzar altos valores de prevalencia (>80%) de este patógeno en lugares sometidos a descargas urbanas, agrícolas e industriales **(Reyes et al., 2025)**.

De manera experimental se identificó que los aislamientos de este microorganismo se dieron principalmente en zonas situadas cerca de viviendas y caseríos. Según **Chevez et al. (2024)**, la proximidad a zonas residenciales en un radio de 500 metros puede afectar la calidad del agua por descargas domésticas, sistemas sépticos

deficientes y la cría de animales de traspatio, además, destacaron que la cercanía de corrales y gallineros favorece la contaminación por heces de aves y cerdos incluso si estas se encuentran a varios kilómetros del canal.

Tabla 5

Perfil metabólico de las cepas aisladas en el canal de riego Mocha-Quero- Ladrillos.

Código de cepa	Sección de muestreo	Patrón de crecimiento en agar XLD	Compatibilidad bioquímica
S.A.1	Inicio del canal	Colonias amarillas	No compatible
S.A.2	Zona de captación	Colonias negras	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.3	Estructura hidráulica N.° 1 (sifón 1)	Colonias negras con halos rojizo	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.4	Canal principal (Zona residencial)	Colonias negras con halos rojizo	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.5	Canal principal (Zona residencial)	Colonias negras	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.6	Canal principal (Zona pecuaria)	Colonias negras con halos rojizo	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.7	Canal principal (Zona periurbana)	Colonias negras con halos rojizo	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.8	Acueducto (Zona agrícola)	Colonias amarillas	No compatible
S.A.9	Canal secundario (Zona residencial)	Colonias Negras	No compatible
S.A.10	Canal principal (Zona agrícola)	Colonias amarillas	No compatible
S.A.11	Canal principal (Zona agrícola)	Colonias amarillas	No compatible

Continúa

Tabla 4

Perfil metabólico de las cepas aisladas en el canal de riego Mocha-Quero- Ladrillos.

Código de cepa	Sección de muestreo	Patrón de crecimiento en agar XLD	Compatibilidad bioquímica
S.A.12	Estructura hidráulica N.° 2 (sifón 2)	Colonias negras	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.13	Zona de descarga de la estructura hidráulica N.° 3 (sifón 3)	Colonias negras con halos rojizo	Perfil compatible con *Salmonella spp.*
S.A.14	Canal principal (Zona agrícola)	Colonias amarillas	No compatible
S.A.15	Canal principal (Zona agrícola)	Colonias amarillas	No compatible
S.A.16	Canal principal (cruce con carretera)	Colonias amarillas	No compatible
S.A.17	Zona terminal	Colonias amarillas	No compatible

Nota. Los resultados de las pruebas bioquímicas permitieron discriminar las muestras compatibles con *Salmonella* spp. de aquellas con crecimiento de microorganismos no pertenecientes al género.

La presencia recurrente del patógeno en puntos de captación y en estructuras hidráulicas como los tres sifones del canal, refleja un fenómeno que ha sido documentado en sistemas de riego abiertos. Según **Bhatti et al. (2023)**, factores como el tipo de material de tuberías, su rugosidad, el tiempo de retención del agua y la presencia de materia orgánica disuelta pueden favorecer la supervivencia de *Salmonella* dentro del sistema hídrico.

El patrón de crecimiento observado en el agar XLD permitió realizar una diferenciación preliminar de las cepas aisladas. En la composición de este medio se

encuentra xilosa, lactosa y sacarosa como sustratos fermentables, lisina para detectar la descarboxilación y tiosulfato para mostrar la producción de H_2S **(Neyaz et al., 2024)**. Estos componentes permiten diferenciar a *Salmonella,* puesto que se distingue por su metabolismo característico, inicialmente fermenta la xilosa y una vez que este azúcar se agota, comienza a descarboxilar la lisina, este proceso genera un pH alcalino en el medio dando como resultado una coloración roja. Además, de que esta bacteria produce H_2S, lo que da lugar a centros negros **(Wang et al., 2025)**.

Sin embargo, aunque el agar XLD es útil para la identificación preliminar, su especificidad no es absoluta, ya que en la cepa S.A.9 a pesar de presentar colonias negras no coincidió con el perfil bioquímico. Esto se podría tratar de otros géneros bacterianos como *Proteus*, *Shigella* y *Pseudomonas,* lo cuales pueden formar colonias morfológicamente similares, debido a que algunas de estas bacterias también transforman el tiosulfato **(El-Saeed et al., 2024)**. Por ello, dado que el agar utilizado es un medio selectivo, pero no definitivo, se aplicaron pruebas bioquímicas para confirmar la identidad de las cepas como se muestra en el **Anexo 1**.

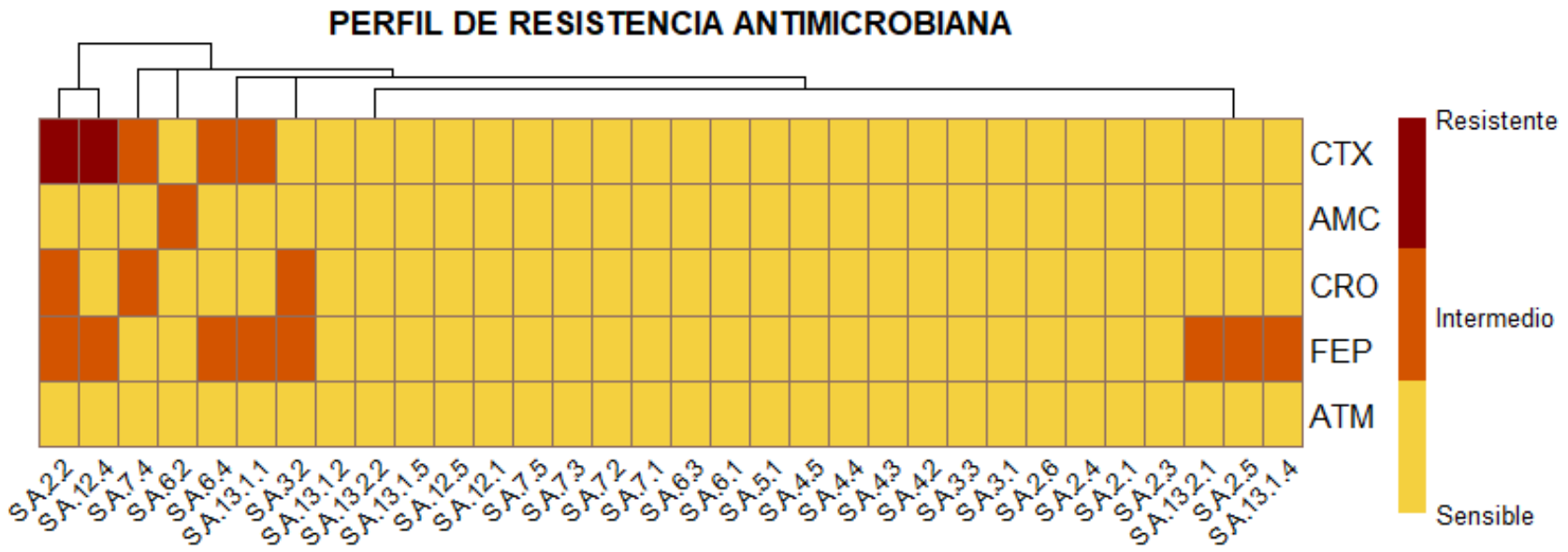
Estas pruebas evalúan rasgos metabólicos clave, por ejemplo, en la prueba TSI *Salmonella* presentó un slant alcalino (rojo), fondo ácido (amarillo) y producción de H_2S. Según **Addams & Lainhart (2021)**, la mayoría de serovares fermentan sólo la glucosa; al terminarse la misma en la superficie, la bacteria empieza a degradar peptonas generando un pH alcalino en el slant y mantienen un pH ácido en el fondo, además que reducen el tiosulfato a H_2S que reacciona con sales de hierro formando un precipitado negro en el fondo; esta prueba permite descartar la presencia de *Shigella* y *Pseudomonas*, ya que estas no producen H_2S. En el caso de la prueba de citrato de Simmons, fue positiva. El medio de Simmons contiene citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. Las bacterias que poseen permeasas de citrato y la enzima citrato liasa pueden metabolizar este componente, produciendo oxalacetato y acetato. El oxalacetato se transforma en piruvato y dióxido de carbono (CO_2). El CO_2 reacciona con sodio y agua, dando como resultado carbonato de sodio, este eleva el pH del medio provocando que el indicador bromotimol cambie de verde a azul **(Hafezi & Khamar, 2024).**

La prueba de urea para *Salmonella* fue negativa; algunas bacterias como *Proteus* producen enzima ureasa, la cual es capaz de hidrolizar la urea en amonio y CO_2, el amonio aumenta el pH del medio y cambia el color del indicador a una tonalidad roja o magenta **(Diarra et al., 2024)**. En el caso de la prueba de rojo de metilo, organismos como *Salmonella* tienen la capacidad de realizar una fermentación mixta de glucosa, dando como resultado grandes cantidades de ácido estables, lo que reduce el pH por debajo de 4,4. La adición del reactivo rojo de metilo produce color rojo intenso en muestras positivas, mientras que un color amarillo/naranja indica ausencia de fermentación mixta **(Arbab et al., 2025)**. Según **Fatima et al. (2023)**, la prueba catalasa (+) y oxidasa (-), es característica de la familia *Enterobacteriaceae*. El uso de este conjunto de pruebas fue respaldado por la necesidad de garantizar que la colonia sospechosa corresponda a *Salmonella* y no a un microorganismo de apariencia similar **(Neyaz et al., 2024)**.

Por otro lado, también se realizó un cribado de cepas con el método de difusión en disco. Según **Aldea et al. (2025)**, este método es estandarizado, reproducible y recomendado por el CLSI y el EUCAST. En la **Figura 4** se observa que la mayoría de los aislados fueron sensibles a amoxicilina-clavulanato, ceftriaxona, cefepima y aztreonam. Estos son antibióticos β-lactámicos eficaces frente a *Salmonella* por su afinidad para unirse a proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), lo que provoca lisis y muerte de la bacteria por la degradación de su pared celular **(Dörr, 2021)**. También se observó la presencia de cepas (S.A.2.2 y S.A.12.4) con una posible resistencia a cefotaxima, dicho comportamiento puede atribuirse a β-lactamasas de espectro extendido (ESBL), las CTX-M son el tipo de ESBL más prevalente en *Enterobacteriaceae*, por lo que generalmente presenta mutaciones que amplía el espectro de hidrólisis hacia las cefalosporinas de tercera generación **(Castanheira et al., 2021)**. Según **Li et al. (2025)**, la heterorresistencia se caracteriza por la presencia de una subpoblación cuya concentración inhibitoria (CMI) es ≥ 8 veces superior a la de una población dominantemente sensible. Este fenómeno coincide con lo observado en el presente estudio, donde aislamientos de un mismo punto mostraron halos de inhibición variables clasificados como resistentes o intermedios, a pesar de que la población principal se comportó como sensible.

Figura 4

Mapa de calor del perfil fenotípico de resistencia a antibióticos β-lactámicos en los aislamientos de Salmonella spp.



Nota. La figura representa el perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* frente a cinco *β-lactámicos:* cefotaxima (CTX), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), ceftriaxona (CRO), cefepima (FEP) y aztreonam (ATM), evaluados mediante el método de difusión en disco. Cada disco contuvo una concentración estándar de 30 µg del antibiótico correspondiente. Los colores indican el resultado interpretado según los puntos de corte del CLSI: sensible (amarillo), intermedio (naranja) y resistente (vino). El dendograma superior agrupa las cepas de acuerdo con la similitud de sus perfiles de resistencia.

3.1.2 Análisis de las secuencias del genoma completo de las cepas de *Salmonella spp.* aisladas mediante secuenciación de tercera generación.

El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de tercera generación como Nanopore, ha transformado la obtención y análisis de los genomas completos de *Salmonella* **(Luan et al., 2024).** La capacidad de estas tecnologías para generar lecturas largas ha permitido abarcar regiones estructurales complejas, optimizando de esta manera la reconstrucción de cromosomas y elementos móviles **(Xu et al., 2020)**. A ello se suma la integración de *pipelines* especializados para ensamblaje, pulido y anotación, los cuales han fortalecido el procesamiento y análisis de los datos genómicos, posibilitando una evaluación más detallada de los elementos que conforman a estos patógenos **(Lin et al., 2021)**.

El análisis genómico de cada aislamiento mostró que todas las cepas correspondieron al serovar de *S.* Typhimurium como se presenta en la **Tabla 5**. Este serovar es uno de los más frecuentes en aguas superficiales y subterráneas, su persistencia se encuentra relacionada con la presencia del gen *hilA*, el cual regula la expresión de fenotipos invasivos y la capacidad del patógeno para tolerar diversas condiciones ambientales **(Rocha et al., 2022)**. Además, la presencia de este serovar está asociada con la descarga de aguas residuales sin tratamiento y la proximidad a granjas **(Reyes et al., 2025)**.

Por otro lado, el tamaño del genoma de las cepas obtenidas oscila entre 4,97 a 4,95 Mbp, a excepción de la cepa S.A.6.4 que presentó un tamaño de 4,43 Mbp. Estos valores se encuentran dentro del rango esperado para *S.* Typhimurium, cuyo genoma suele variar entre 4,89 y 5,02 Mbp, con un contenido de GC entre 51,9 a 52,2% **(Kim et al., 2025)**. Asimismo, la mayoría de cepas presento un ensamblaje constituido por 2 contigs, mientras que la cepa de menor tamaño mostro 41 contigs. Según estudios, para que un ensamblaje se considere ideal debe contener un contig por replicón (cromosoma y plásmidos). Sin embargo, cuando existe un mayor número de contigs puede atribuirse a

errores de secuenciación, regiones repetitivas, cobertura desigual o contaminación **(Wick et al., 2023).**

Los valores obtenidos de CDS, rRNA, tRNA y el número de proteínas hipotéticas también mostraron variabilidad, lo cual es normal entre ensamblajes con diferentes grados de fragmentación **(Chen et al., 2024).** Los ensambles más completos tienden a recuperar el número típico de genes, mientras que los más fragmentados pueden perder o duplicar genes ribosomales, y tRNA, además de presentar varios ORFs espurios **(Carhuaricra et al., 2022)**.

Con herramientas de la plataforma Galaxy se pudo identificar la presencia de plásmidos correspondientes a los tipos IncFIB (S) e IncFII (S). Estos han sido reportados en cepas de diferentes matrices de aislamiento, con frecuencias superiores al 40%. Estos plásmidos suelen albergar genes de virulencia (*spv*) y genes de resistencia a múltiples antimicrobianos, los cuales son comunes en *S.* Typhimurium **(Lim et al., 2024)**. De la misma manera, se detectó la presencia del gen amiglucósido acetiltransferasa (*aac(6')-Iaa*) codificado cromosómicamente en *Salmonella*, el cual confiere resistencia a la tobramicina y kanamicina **(Srednik et al., 2022)**. Estudios previos han determinado que el 95,2% de las cepas portan dicho gen, aunque suele ser transcripcionalmente silencioso **(Tang et al., 2022)**.

Tabla 6

Características genómicas y perfil antigénico de los aislamientos de Salmonella.

Código de cepa	S.A.2.6	S.A.12.3	S.A.6.4	S.A.5.1	S.A.2.2	S.A.4.3	S.A.7.4	S.A.3.2	S.A.13.1
Tamaño del genoma (pb)	4.936.396	4.935.715	4.439.160	4.944.620	4.939.846	4.926.564	4.929.956	4.928.569	4.935.732
Genes de resistencia	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa	aac(6')-Iaa
Género	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*	*Salmonella*
Especie	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*Entérica*	*enterica*
Subespecie	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*enterica*	*Entérica*	*enterica*
Serovar	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium
Perfil antigénico	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2	4:i:1,2
Contigs	2	2	41	2	2	2	2	2	2
Plásmidos	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)	IncFIB (S) IncFII (S)
Porcentaje G+C (%)	51,93	51,93	52,57	52,62	52,62	52,04	52,63	52,07	52,62

Continúa

Tabla 5

Características genómicas y perfil antigénico de los aislamientos de Salmonella.

Código de cepa	S.A.2.6	S.A.12.3	S.A.6.4	S.A.5.1	S.A.2.2	S.A.4.3	S.A.7.4	S.A.3.2	S.A.13.1
Contigs N_{50} (pb)	4.841.882	4.841.213	181.511	4.849.948	4.845.266	4.832.233	4.835.518	4.810.534	4.841.082
Contigs L_{50} (pb)	1	1	9	1	1	1	1	1	1
CDS	6510	6465	9341	6076	6386	7309	6911	7586	6484
tRNA	87	87	85	86	86	86	88	87	86
rRNA	22	22	22	22	19	17	22	22	18
Proteínas hipotéticas	1536	1529	2189	1444	1578	1602	1542	1579	1519
Proteínas funcionales	11010	10848	10810	10726	10879	11176	11047	11222	10906
% de Completitud	98,8	97,6	87,5	98,8	97,6	100	97,6	95,1	98,8

Nota. La tabla presenta los resultados del análisis genómico y serotipificación de los aislamientos obtenidos. La caracterización se realizó mediante herramientas bioinformáticas como ResFinder, Proksee, Galaxy y BV-BRC.

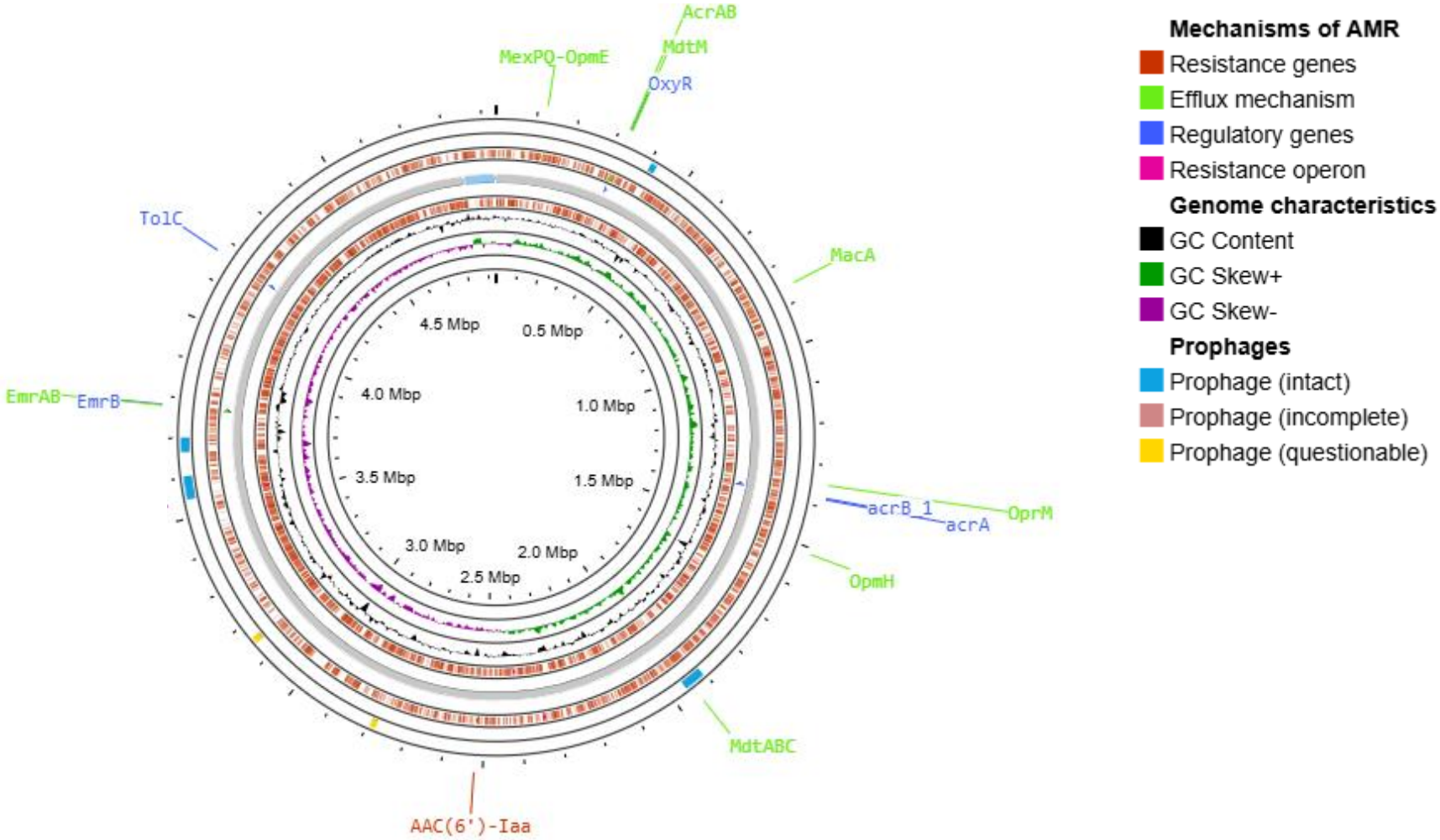
En los mapas circulares de cada cepa mostrados en la **Figura 5** se ilustran los genes asociados con distintos mecanismos de resistencia antimicrobiana. En estas representaciones genómicas se destaca la presencia de genes reguladores como *marA*, *marB*, marR, *hns* y *oxyR*, los cuales modulan la expresión tanto de los determinantes de resistencia como de las bombas de eflujo. El operón marRAB está compuesto por un represor (MarR) y activadores (MarA y MarB) que responden a estresores químicos; cuando el gen *marR* se inactiva, *marA* se sobreexpresa e induce la transcripción de *acrAB-tolC* y de otros genes relacionados con multirresistencia **(Chubiz, 2023)**.

De manera complementaria, *ramA* actúa como un activador central en *Salmonella,* cuando se sobreexpresa incrementa la transcripción de AcrAB-tolC. Estas bombas de eflujo son proteínas de membrana que participan en el transporte activo de antimicrobianos, metabolitos y otros compuestos hacia el exterior de la célula, reduciendo la cantidad de antibiótico que alcanza su diana intracelular **(Ricci et al., 2023)**. En *S.*Typhimurium, AcrAB-tolC se reconoce como la bomba RND (Resistencia-Nodulación-División) mejor caracterizada y uno de los principales determinantes de la resistencia intrínseca, ya que su sobreexpresión se asocia con la expulsión de quinolonas, β-lactámicos, cloranfenicol, tetraciclinas y con incrementos en la concentración mínima inhibitoria (CIM) de diversas familias de antibióticos **(Kim et al., 2025)**. En los mapas también se visualiza componentes accesorios de esta bomba de eflujo, entre ellos se encuentra AcrZ, AcrD y AcrEF, que complementan dicho sistema para determinados sustratos y contribuyen a mantener el fenotipo MDR incluso cuando AcrAB se ve parcialmente comprometido **(El-Demerdash et al., 2024)** .

Por otro lado, la bomba MacAB, protege a *Salmonella* frente a macrólidos y compuestos asociados al estrés en el intestino inflamado y en macrófagos, además de participar en la tolerancia al estrés oxidativo. A su vez, transportadores de la familia MFS como MdfA, EmrAB y AmrD expulsan una amplia gama de antibióticos hidrofóbicos, mientras que bombas plasmídicas como OqxAB y QepA se han descrito como determinantes de resistencia a fluoroquinolonas (PMQR) **(Huang et al., 2022)**.

Figura 5

Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

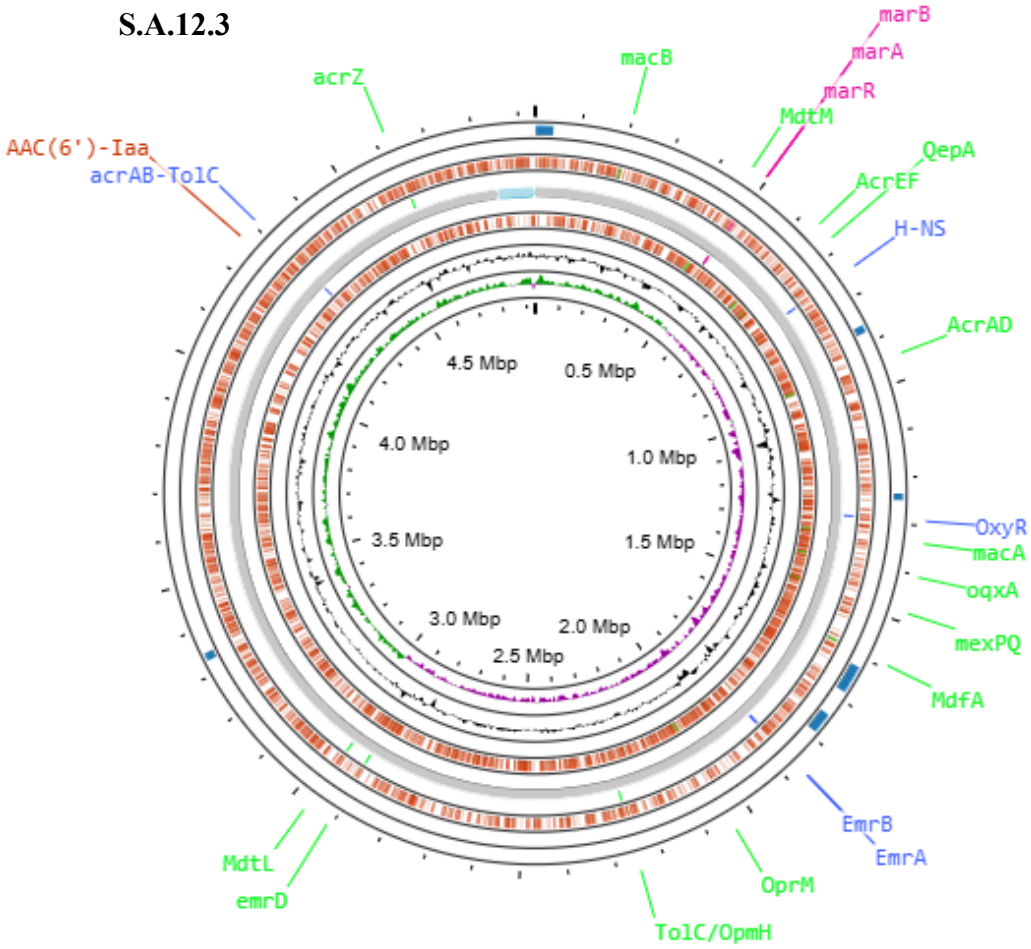


Continúa

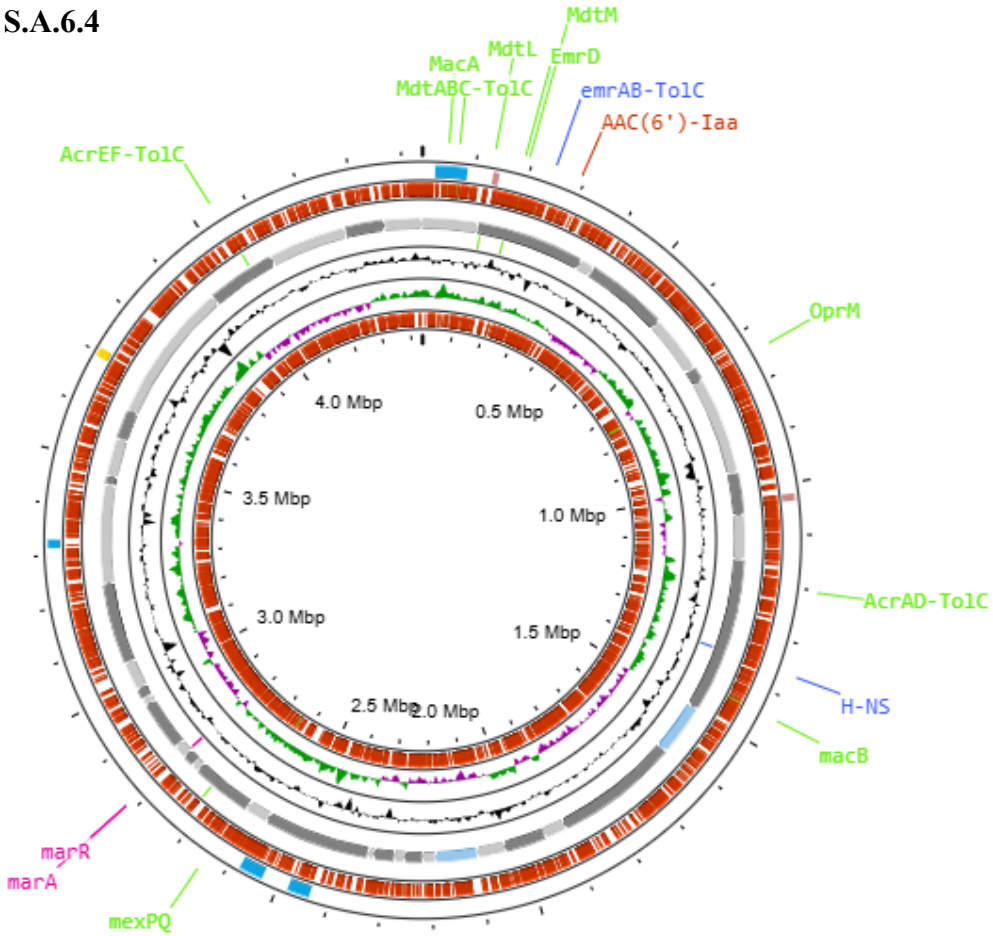
Figura 5

Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

S.A.12.3



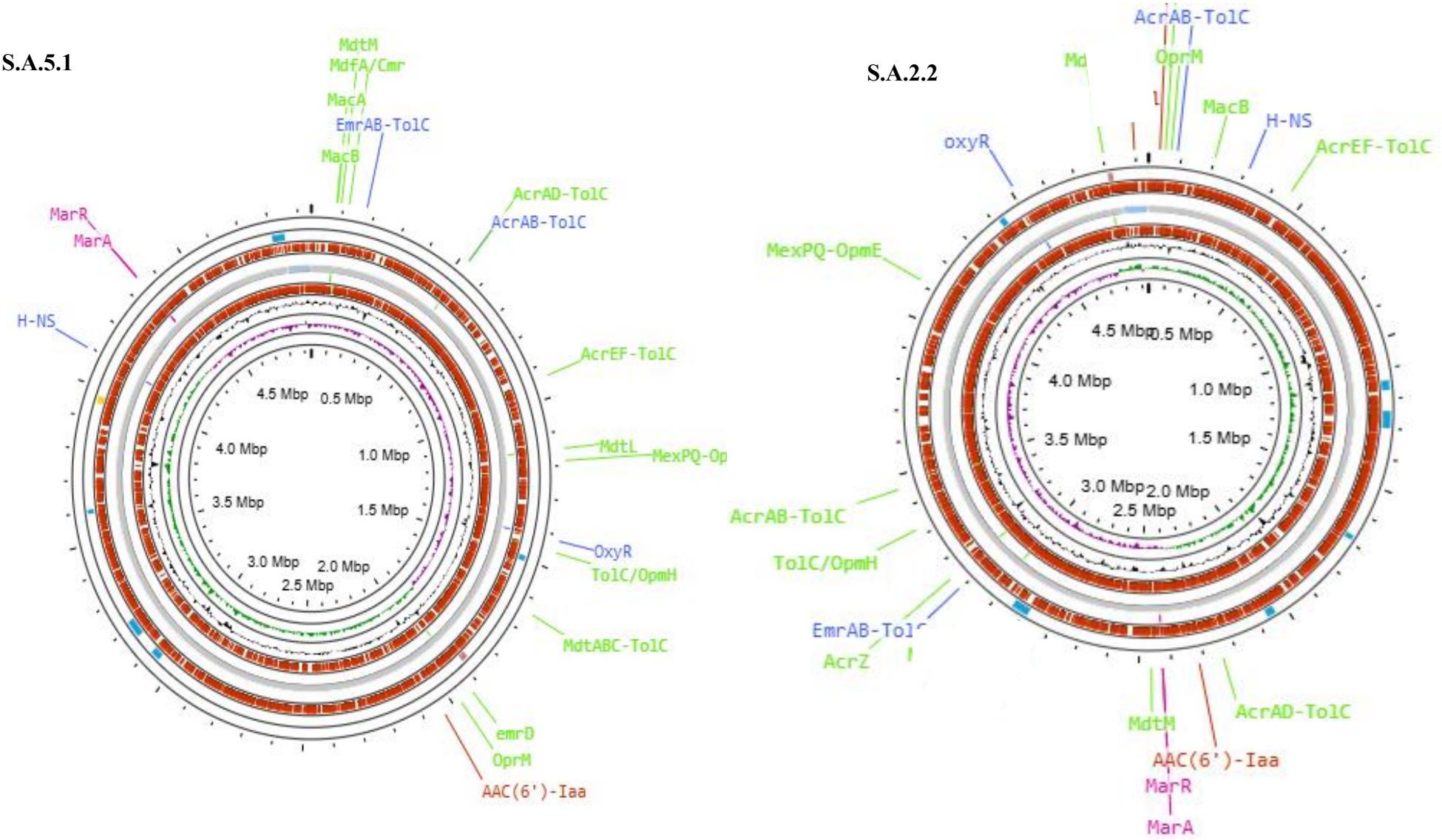
S.A.6.4



Continúa

Figura 5

Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

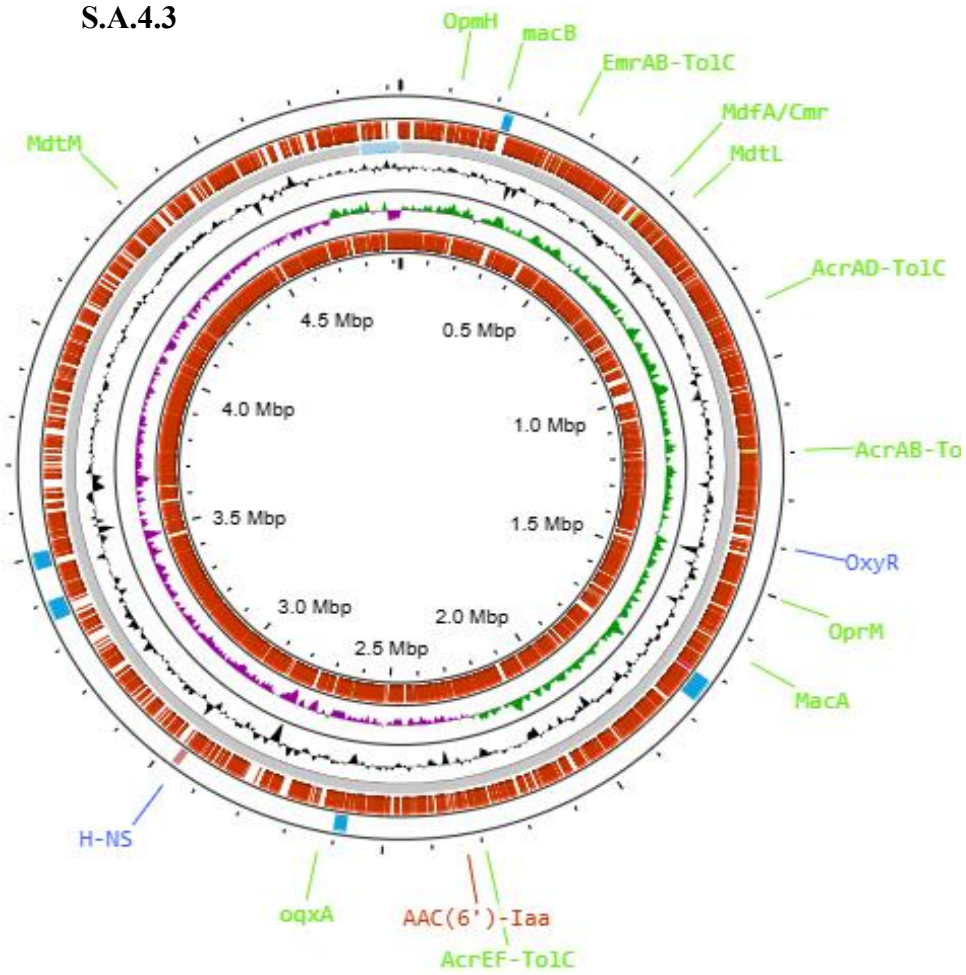


Continúa

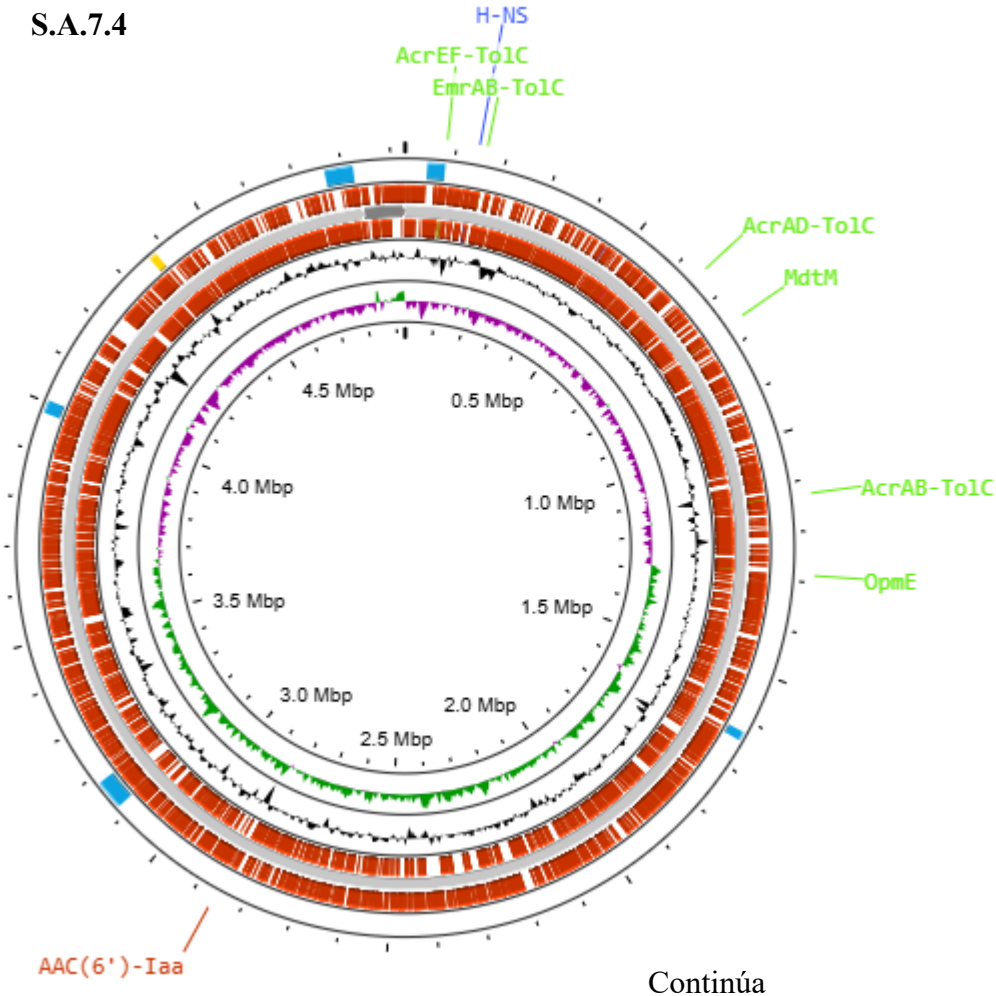
Figura 5

Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.

S.A.4.3



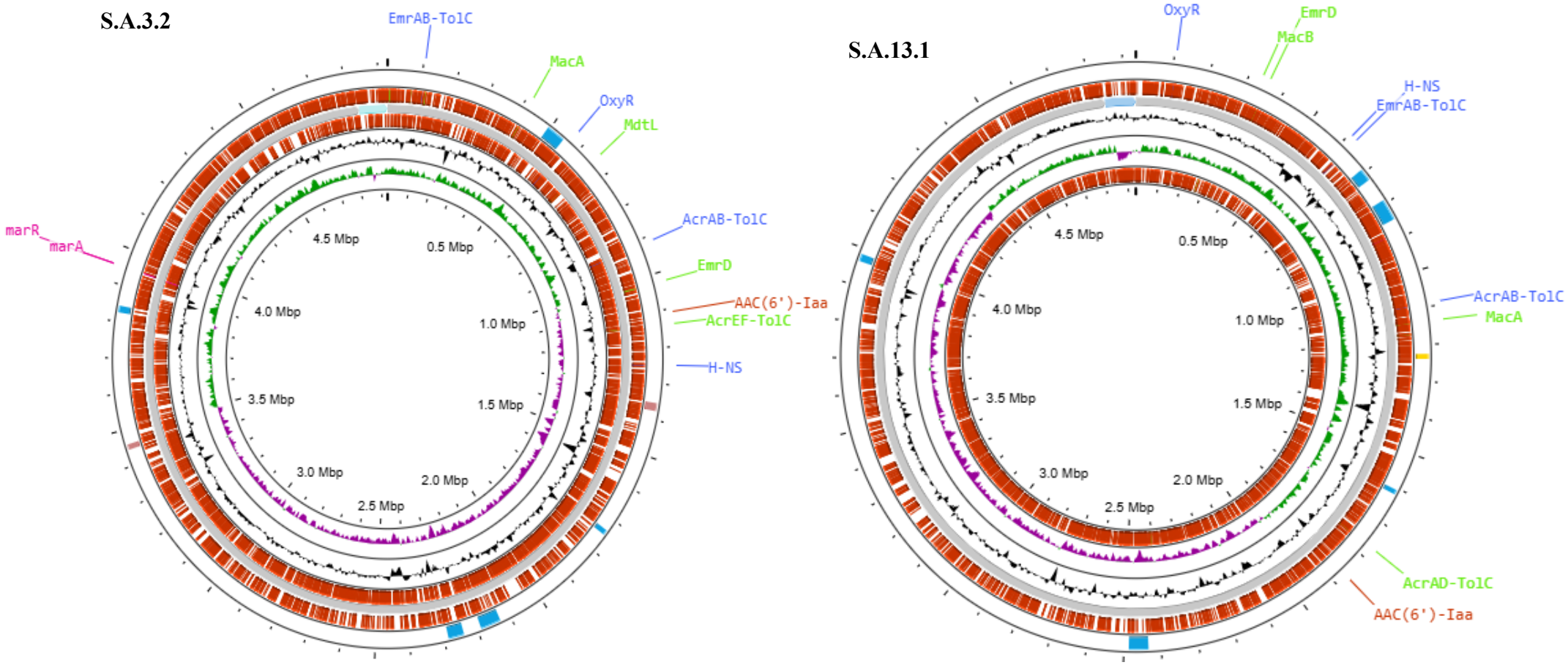
S.A.7.4



Continúa

Figura 5

Mapas circulares del genoma de las cepas de S.Typhimurium aisladas en el canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos.



Nota. Los mapas muestran la distribución de genes asociados a mecanismos de resistencia antimicrobiana (AMR), incluyendo genes de resistencia, reguladores, operones y bombas de eflujo, diferenciados por colores según su categoría funcional. Las capas internas representan el contenido de GC y los perfiles de sesgo (GC skew), los cuales permiten visualizar la variación en la proporción de guanina y citosina, así como la orientación replicativa a lo largo del genoma. Las regiones de profagos fueron identificadas mediante PHASTER y fueron clasificadas según su puntuación de integridad.

En las capas internas de los mapas genómicos también se representó el contenido de GC. Un contenido elevado de GC contribuye a una mayor estabilidad del ADN y a patrones específicos del uso de codones, lo que puede modular la eficiencia del proceso de traducción y la adaptación a diferentes nichos específicos. El análisis del sesgo de GC permite identificar la dirección de la replicación, señalando los orígenes y terminaciones del proceso replicativo. En los mapas también se observó variaciones locales en el contenido y sesgo de GC circundante, estas fluctuaciones generalmente indican posibles islas genómicas, como las islas de virulencia o la presencia de elementos profágicos, ya que los genomas de fagos integrados suelen presentar un GC diferente al del huésped **(Chen & Skylaris, 2021)**.

Así también, estudios genómicos indican que *Salmonella* se considera polylosogénica, alojando múltiples profagos. Sin embargo, esto depende del tipo de serovar, en el caso de *S.* Typhimurium tiene un alto rango de profagos que va de 8,2 a 9,0 por cepa **(Andrews et al., 2024)**. En la **Figura 5** se puede observar que hay menos profagos del rango establecido, esto puede deberse a que su presencia depende del linaje específico y de la calidad del ensamblaje, es decir los profagos fragmentados en contigs cortos pueden pasar desapercibidos, ya que PHASTER requiere ciertos umbrales para detectar un profago, por lo que no puede reconocer regiones muy degradas o incompletas. En esta herramienta se clasifican los elementos profágicos en tres categorías principales según su score, se consideran intacto (> 90), cuestionable (70-90) o incompletos (< 70) **(Wishart et al., 2023)** .

Según **Andrews et al. (2024),** en *S.* Typhimurium se ha observado que muchos profagos intactos conservan módulos funcionales completos y suelen portar genes de virulencia o adaptación como moduladores de lipopolisacáridos, factores anti-oxidantes o efectores de secreción. Mientras que los profagos catalogados como incompletos o cuestionables suelen actuar como reservorios genéticos, ya que contienen fragmentos de genes que pueden recombinarse con el genoma bacteriano y aumentar la plasticidad genética, aunque ya no formen partículas infecciosas viables. Los profagos facilitan la transferencia horizontal de genes de resistencia y virulencia, modulando la aptitud ecológica del patógeno **(Yan et al., 2023).**

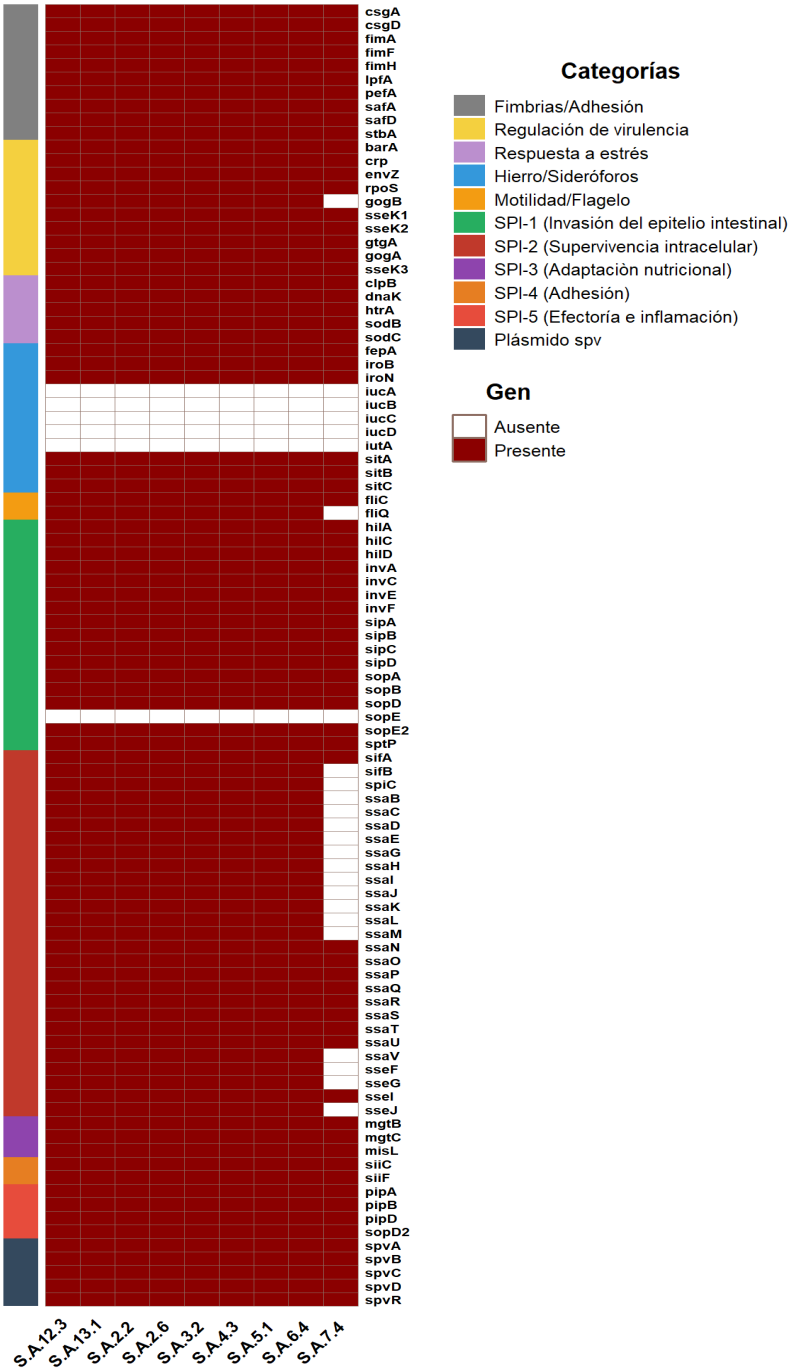
Con relación a la virulencia de *S.*Typhimurium se considera que es multifactorial, ya que involucra estructuras de adhesión, sistemas reguladores globales, mecanismos de respuesta al estrés, adquisición de hierro, motilidad flagelar, varios islotes de patogenicidad (SPI-1 a SPI-5) y el operón spv del plásmido de virulencia como se observa en la **Figura 6**. Cada categoría de genes contribuye de modo específico al proceso infeccioso **(Worley, 2025)**. En el mapa de calor se observa la presencia de la mayoría de estos genes en las cepas estudiadas, lo que determina que las bacterias poseen las funciones virulentas tradicionales de *S.* Typhimurium.

En el caso de las fimbrias y adhesinas permiten la fijación inicial de la bacteria al epitelio intestinal y la formación de biopelículas. Entre las proteínas relevantes están CsgA, CsgD (curli) y fimbrias tipo 1. Estos genes han sido documentados como factores de adhesión virulenta que funcionan como mediadores de unión a oligosacáridos de alta manosa de células eucariotas **(Yan et al., 2023)**. Este operón está presente en más del 80% de aislamiento clínicos. La función general de las fimbrias es facilitar la colonización intestinal y el inicio de la infección. Todas las cepas en la figura presentan estos genes, lo que sugiere una alta capacidad de adhesión típica **(Yin et al., 2022).**

Por otro lado, los genes reguladores coordinan la expresión de factores de virulencia según las señales ambientales. En el gráfico se incluyen factores relevantes como BarA, Crp, EnvZ y el factor sigma RpoS. Estos reguladores controlan la activación de SPIs, sistemas de secreción tipo III y otros genes de virulencia en respuesta al pH, magnesio bajo o estrés **(Sia et al., 2025)**. Estos genes activan la transcripción del operón *spv* del plásmido de virulencia, el cual permite aumentar la capacidad de la bacteria para invadir órganos internos y sobrevivir en macrófagos. Rpos reduce notablemente la letalidad y la diseminación a ganglios linfoides **(Jerez et al., 2024).** La supervivencia dentro del hospedador requiere enfrentar varios factores de estrés, por lo que la bacteria conserva genes como *clpB*, *dnaK* (proteínas de choque térmico), *htrA* (proteasa periplásmica chaperona) y superóxido dismutasas (*sodB*, *sodC*). Estos mecanismos le permiten resistir al calor, desnaturalización proteica y especies reactivas de oxígeno durante la fagocitosis **(Kim et al., 2021)**.

Figura 6

Distribución de genes de virulencia en cepas de S.Typhimurium según sus categorías funcionales.



Nota. La figura muestra la presencia y ausencia de genes de virulencia agrupados en once categorías funcionales relevantes para la patogénesis de *S.*Typhimurium. Las filas representan genes específicos y las columnas corresponden a las cepas analizadas. La coloración lateral codifica la función general del grupo de genes, mientras que las celdas color vino indican la presencia del gen y las blancas su ausencia.

Así también, se observó que las cepas analizadas presentan receptores y enzimas de sideróforos clásicos. Todos estos proporcionan hierro en el ambiente restrictivo del hospedador. Según se observa, en el patrón genético los genes para producción completa de aerobactina (*iucC* e *iucD*) están ausentes (blancos). Esta ausencia implica que las cepas no sintetizan aerobactina por completo, potencialmente reduciendo su capacidad para obtener hierro en situaciones de extrema privación **(Mey et al., 2021).** En el caso de los genes flagelares codifican la estructura de los flagelos, los cuales proporcionan motilidad nadante. La movilidad flagelar favorece la penetración en la mucosa intestinal y estimula la respuesta inmune innata, se ha determinado que la flagelina es un factor clave de virulencia, el cual facilita la colonización y diseminación en el intestino **(Cui et al., 2021)**.

También se identificó genes que forman parte de las diferentes islas de patogenicidad, por ejemplo, en SPI-1 se destaca genes reguladores como *hilA*, *hilC*, *hilD,* los componentes estructurales *invA*, *invC*, *invE*, *invF* y los efectores translocados. SPI-1 codifica un sistema de secreción tipo III (T3SS-1), su función principal es organizar la inyección de efectores a las células epiteliales, induciendo a endocitosis bacteriana y la inflamación intestinal **(Li et al., 2025)**. En el mapa de calor todos los genes de esta categoría están presentes, lo que significa que las cepas pueden tener una alta capacidad invasiva intestinal. En el caso de efectores de SPI-2 sirven para promover la supervivencia y replicación dentro de macrófagos y células epiteliales, estos modifican la vesícula intracelular, interfieren con la respuesta inmune y facilitan el metabolismo intravacuolar **(Lawrence et al., 2021)**. En relación con SPI-3 se incluye genes como *misL* (proteína de membrana) y *mgtC, mgtB* (transporte de magnesio). La conservación de este islote asegura que la bacteria tenga un mejor manejo de la nutrición intracelular **(Jerez et al., 2024).**

La presencia de SPI-4 y SPI-5 no es tan crítica como las anteriores. Sin embargo, son relevantes, ya que SPI-4 permite la adhesión al epitelio distal, mientras que los efectores de SPI-5 potencian la inflamación sistémica y la diseminación, es decir la presencia de estos islotes amplían la capacidad de la bacteria para manipular la inmunidad del hospedador **(Sia et al., 2025).**

3.1.3 Evaluación de las relaciones filogenéticas entre los genomas completos obtenidos y secuencias de *S.* Typhimurium de distintos orígenes.

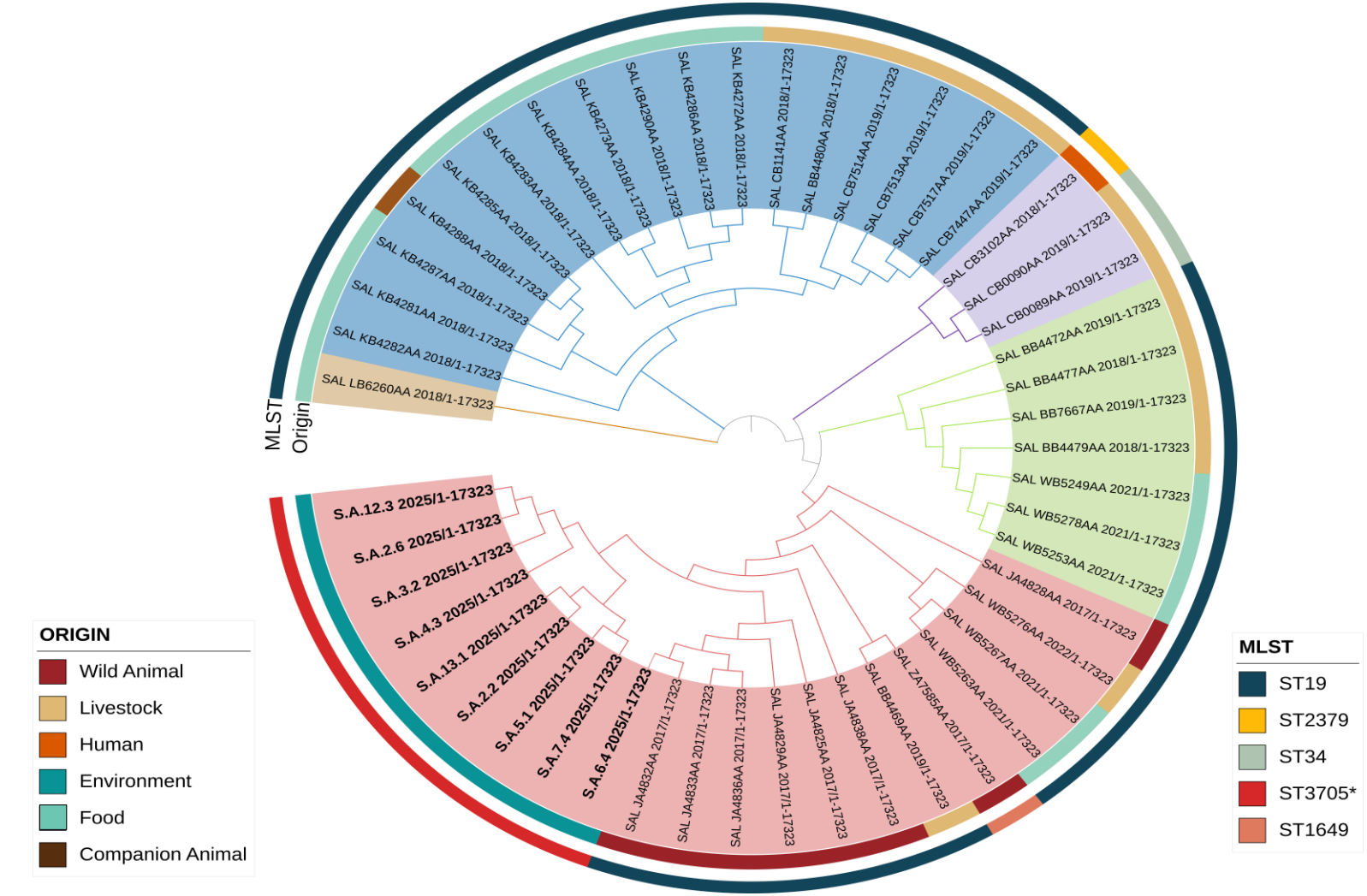
Para el análisis filogenético se seleccionaron 49 aislamientos ecuatorianos procedentes de diferentes fuentes, entre ellas 8 fueron obtenidas de animales salvajes, 13 de ganado, 1 de humanos, 1 de un animal de compañía, 17 de origen alimentario y 9 ambientales derivadas del canal de riego como se observa en la **Figura 7.** La tipificación mediante MLST reveló que en Ecuador los linajes predominantes de *S.* Typhimurium corresponden al tipo de secuencia ST19 y ST34 **(Gómez-Baltazar et al., 2023)**. Esta distribución coincide con estudios internacionales que identifican a ST19 como el linaje clásico de este serovar, el cual es comúnmente detectado en muestras animales y alimentarias y relacionado con casos de salmonelosis en humanos. Por su parte, ST34 se ha identificado en diversas matrices, aunque con mayor prevalencia en productos derivados del cerdo, dicho linaje se caracteriza por presentar un fenotipo multirresistente **(Wang et al., 2025)**.

En el árbol filogenético basado en SNPs las nueve cepas obtenidas en el canal de riego formaron un clado monofilético, coloreado en rosa y tipificado como ST3705*. Este grupo se distingue por presentar ramas internas cortas, lo que determina que entre sí hay baja divergencia de SNP, constituyéndolo como un linaje ambiental homogéneo en el canal **(Reyes et al., 2025)**. Este subgrupo se encuentra filogenéticamente anclado a un bloque más amplio compuesto por asilamientos ST19 y ST1649 de origen animal y alimentario **(Vinueza-Burgos et al., 2025).** En relación con la estructura poblacional de este serovar, se ha documentado que aproximadamente el 86% de los genomas depositados en Enterobase pertenecen al ST19 **(Perez-Sepulveda & Hinton, 2025).**

El esquema clásico de MLST para *Salmonella* se fundamenta en siete genes constitutivos (*aroC, dnaN, hemD, hisD, purE, sucA* y *thrA*) cuyos alelos se combinan para generar un perfil numérico que define el tipo de secuencia. Este sistema permite agrupar diversos ST dentro de *S.* Typhimurium, aunque linajes como ST19, ST313 o ST1649 concentran la mayoría de los aislamientos de relevancia clínica y alimentaria **(Yan et al., 2023)**.

Figura 7

Árbol filogenético de aislamientos ecuatorianos de S.Typhimurium de distintos orígenes.



Nota. Se utilizaron 49 aislamientos para construir la filogenia, incluidos los nueve de este estudio, con su clasificación MLST y orígenes representados en anillos concéntricos.

La designación de ST3705* surge del análisis MLST realizado sobre los siete genes constitutivos del esquema de Achtman, en el cual todos los loci mostraron una coincidencia superior al 99%, pero varios presentaron alelos con ciertas variaciones (indels o sustituciones) que no coinciden con los depositados en la base de datos, es por ello que la herramienta utilizada le asigna el tipo de secuencia más cercano a las cepas (ST3705) y marca el perfil con un asterisco para indicar un genotipo no descrito previamente, ya que tiene uno o más alelos divergentes **(Yan et al., 2021)**.

Sin embargo, esto no afecta al conjunto de SNPs de alta calidad utilizados por CSIPhylogeny para la reconstrucción filogenética, por lo que la posición evolutiva del clado ST3705* sigue siendo consistente en relación a los linajes zoonóticos. El origen de este linaje en el canal de riego puede estar relacionado a fuentes fecales de animales y residuos alimentarios, los cuales pudieron haber llegado por precipitaciones o descargas de aguas residuales **(Reyes et al., 2025)**.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La caracterización genómica de las cepas de *Salmonella* aisladas del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos se realizó mediante tecnologías avanzadas de secuenciación de tercera generación, lo que permitió obtener ensamblajes completos para el 88,8% de las cepas estudiadas. Esta metodología facilitó la identificación de regiones codificantes, elementos móviles, factores de virulencia y determinantes de resistencia antimicrobiana, estableciendo una base sólida para comprender su comportamiento a nivel molecular. El enfoque aplicado resultó adecuado para el análisis de cepas de *Salmonella* presentes en matrices ambientales, aportando evidencia sobre su capacidad para adaptarse y persistir en aguas superficiales con implicaciones potenciales para la seguridad alimentaria y sanitaria.

- El aislamiento selectivo de *Salmonella* en muestras de agua del canal de riego junto con la ejecución de pruebas diferenciales confirmó la presencia del patógeno en el 47% de los puntos evaluados, especialmente en zonas asociadas a descargas domésticas, áreas residenciales y sectores con actividad pecuaria. Así también, la aplicación del método de difusión en disco demostró que los aislamientos son capaces de modular su comportamiento ante diferentes antibióticos de uso común. La persistencia de colonias características en puntos distantes entre sí demostró que el canal funciona como un ambiente favorable para la supervivencia y circulación del patógeno a lo largo de su extensión. Factores como el aporte constante de materia orgánica y la presencia de estructuras hidráulicas que retienen sedimentos crean condiciones que facilitan su acumulación y permanencia en el sistema de riego.

- La serotipificación *in silico* determinó que el serovar predominante en el canal de riego es *S.* Typhimurium, lo que permitió ubicar la totalidad de los aislamientos dentro de *S.enterica* subsp. *enterica.* Este resultado sirvió como punto de partida para el análisis genómico, ya que confirmó la homogeneidad taxonómica del conjunto de cepas y su coincidencia con un serovar ampliamente documentando en matrices ambientales asociadas a actividades agrícolas y sistemas de riego. El análisis genómico permitió describir características estructurales acordes con este grupo bacteriano, con tamaños genómicos entre 4,95 y 4,97 Mbp, dos contigs en el 88,8% de las cepas, una proporción estable de regiones codificantes y un contenido GC promedio de 52,34%. Las variaciones observadas se relacionaron principalmente con diferencias en la calidad del ensamblaje y grado de fragmentación. Asimismo, se reconoció la presencia de mecanismos de virulencia propios de este serovar, entre ellos sistemas asociados a adhesión, invasión y supervivencia intracelular, que contribuyen a su capacidad para persistir y multiplicarse en matrices acuáticas. En cuanto a su resistencia antimicrobiana todos los aislamientos presentaron el gen aac(6')-Iaa, un determinante intrínseco que confiere resistencia a tobramicina y kanamicina.

- Del análisis de las relaciones filogenéticas de los 49 aislamientos de *S.Typhimurium* se observó que las nueve cepas ambientales del canal de riego Mocha-Quero-Ladrillos conforman un clado monofilético, tipificado como ST3705*, lo que indica que comparten un ancestro reciente común y constituyen un mismo linaje ambiental. Este clado se encuentra filogenéticamente anclado a asilamientos ecuatorianos de dicho serovar pertenecientes a ST19 y ST1649 de origen animal como cuyes, cerdos, aves de corral y productos derivados, evidenciando que las cepas del canal no corresponden a un genotipo exclusivamente acuático, sino a un sublinaje emparentado con clones zoonóticos ampliamente distribuidos en el país.

4.2 Recomendaciones

- Incorporar análisis comparativos que incluyan genomas de *Salmonella* procedentes de matrices ambientales y alimentarias de otros países de América Latina y de repositorios internacionales, empleando esquemas de cgMLST. Este enfoque serviría para situar los aislamientos del canal de riego dentro de clados de importancia internacional y verificar si comparten islas de patogenicidad u otros determinantes genéticos con cepas de relevancia clínica.

- Realizar análisis metagenómicos del agua del canal con el fin de caracterizar el microbioma completo, detectar otros patógenos entéricos y documentar la diversidad de elementos genéticos móviles presentes. Esto permitiría contextualizar los genomas dentro de las dinámicas de intercambio genético del ecosistema acuático y evaluar si el canal actúa como un posible hotspot de transferencia horizontal de genes de resistencia.

- Incorporar una secuenciación complementaria mediante Illumina para reforzar la precisión en la confirmación de alelos, ST y variantes genéticas, integrando estos datos con los ensamblajes obtenidos por lecturas largas para una caracterización genómica más robusta.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Abueg, L. A. L., Afgan, E., Allart, O., Awan, A. H., Bacon, W. A., Baker, D., Bassetti, M., Batut, B., Bernt, M., Blankenberg, D., Bombarely, A., Bretaudeau, A., Bromhead, C. J., Burke, M. L., Capon, P. K., Čech, M., Chavero-Díez, M., Chilton, J. M., Collins, T. J., … Zoabi, R. (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Research*, *52*(W1), W83–W94. https://doi.org/10.1093/nar/gkae410

Addams, J., & Lainhart, W. (2021). The Brief Case: *Salmonella enterica* Serovar Typhi in a Central American Refugee. *Journal of Clinical Microbiology*, *59*(5). https://doi.org/10.1128/JCM.01359-20

Ahmad Bhat, K., Manzoor, T., Ahmad Dar, M., Farooq, A., Ahmad Allie, K., Majeed Wani, S., Ahmad Dar, T., & Asghar Shah, A. (2022). *Salmonella* Infection and Pathogenesis. In *Enterobacteria*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.102061

Aldea, A. C., Diguță, F. C., Presacan, O., Voaideș, C., Toma, R. C., & Matei, F. (2025). Detecting antibiotic resistance: classical, molecular, advanced bioengineering, and AI-enhanced approaches. *Frontiers in Microbiology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1673343

Aleksandrowicz, A., Carolak, E., Dutkiewicz, A., Błachut, A., Waszczuk, W., & Grzymajlo, K. (2023). Better together– *Salmonella* biofilm-associated antibiotic resistance. *Gut Microbes*, *15*(1). https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2229937

Andrews, K., Landeryou, T., Sicheritz-Pontén, T., & Nale, J. Y. (2024). Diverse Prophage Elements of *Salmonella enterica* Serovars Show Potential Roles in Bacterial Pathogenicity. *Cells*, *13*(6), 514. https://doi.org/10.3390/cells13060514

Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., Ge, B., Zhang, G., & Hammack, T. (2024). *BAM Chapter 5: Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/media/172194/download

Annapureddy, P., Gupta, V., & Kumar, G. (2024). The Journey of Genome Sequencing. *Preprints.org*. https://doi.org/10.20944/preprints202408.1719.v1

Arbab, S., Ullah, H., Wang, W., Qadeer, A., Aseeri, A. A., Alzahrani, F. M., Alzahrani, K. J., Alsharif, K. F., & Zhang, J. (2025). Prevalence and antimicrobial drug resistance of gram-negative bacteria in dairy feed and water: a One Health concern. *Frontiers in Veterinary Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1654200

Aruta, M. G., Lari, E., De Simone, D., Semplici, B., Semplici, C., Dale, H., Chirwa, E., Kadwala, I., Mbewe, M., Banda, H., Iturriza-Gomara, M., Gordon, M., Nyirenda, T., Piu, P., Pizza, M., Berlanda Scorza, F., Grappi, S., Canals, R., & Rossi, O. (2023). Characterization of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Quantification of Antibodies against *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis O-Antigens in Human Sera. *BioTech*, *12*(3), 54. https://doi.org/10.3390/biotech12030054

Awang, M. S., Bustami, Y., Hamzah, H. H., Zambry, N. S., Najib, M. A., Khalid, M. F., Aziah, I., & Abd Manaf, A. (2021). Advancement in *Salmonella* Detection Methods: From Conventional to Electrochemical-Based Sensing Detection. *Biosensors*, *11*(9), 346. https://doi.org/10.3390/bios11090346

Aytan-Aktug, D., Clausen, P. T. L. C., Szarvas, J., Munk, P., Otani, S., Nguyen, M., Davis, J. J., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2022). PlasmidHostFinder: Prediction of Plasmid Hosts Using Random Forest. *MSystems*, *7*(2). https://doi.org/10.1128/msystems.01180-21

Bastin, B., Bird, P., Benzinger, M. J., Crowley, E., Agin, J., Goins, D., Sohier, D., Timke, M., Shi, G., & Kostrzewa, M. (2019). Confirmation and Identification of *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp., and Other Gram-Negative Organisms by the Bruker MALDI Biotyper Method: Collaborative Study Method Extension to Include *Campylobacter* Species, Revised First Action 2017.09. *Journal of AOAC International*, *102*(5), 1595–1616. https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1595

Bell, R. L., Kase, J. A., Harrison, L. M., Balan, K. V., Babu, U., Chen, Y., Macarisin, D., Kwon, H. J., Zheng, J., Stevens, E. L., Meng, J., & Brown, E. W. (2021). The Persistence of Bacterial Pathogens in Surface Water and Its Impact on Global Food Safety. *Pathogens*, *10*(11), 1391. https://doi.org/10.3390/pathogens10111391

Bhatti, H., Jawed, R., Ali, I., Iqbal, K., Han, Y., Lu, Z., & Liu, Q. (2021). Recent advances in biological nanopores for nanopore sequencing, sensing and comparison of functional variations in MspA mutants. *RSC Advances*, *11*(46), 28996–29014. https://doi.org/10.1039/D1RA02364K

Bhatti, S., Gadhi, T. A., Mahar, R. B., Ali, I., Channa, N., Kori, J. A., & Bonelli, B. (2023). The Identification of Selective Pathogenic Microbial Community Biofilms in Different Distribution Pipeline Materials and Their Disinfection Kinetics. *Water*, *15*(23), 4099. https://doi.org/10.3390/w15234099

Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). *Salmonella* in the environment: A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, *13*, 100407. https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407

Blakely, G. W. (2024). Mechanisms of horizontal gene transfer and DNA recombination. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 309–324). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00043-5

Calero-Cáceres, W., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Gomes-Dias, C.-A., Bastidas-Caldes, C., Ramírez, M. S., & Harries, A. D. (2023). Whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance in Ecuador: present and future implications. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *47*. https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.8

Calero-Cáceres, W., Villacís, J., Ishida, M., Burnett, E., & Vinueza-Burgos, C. (2020). Whole-Genome Sequencing of *Salmonella enterica* Serovar Infantis and Kentucky Isolates Obtained from Layer Poultry Farms in Ecuador. *Microbiology Resource Announcements*, *9*(13). https://doi.org/10.1128/MRA.00091-20

Carhuaricra Huaman, D. E., Luna Espinoza, L. R., Rodríguez Cueva, C. L., Duran Gonzales, C. G., Rosadio Alcántara, R. H., Setubal, J. C., & Maturrano Hernández, L. (2022). Genomic Characterization of *Salmonella* Typhimurium Isolated from Guinea Pigs with Salmonellosis in Lima, Peru. *Microorganisms*, *10*(9), 1726. https://doi.org/10.3390/microorganisms10091726

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, *3*(3). https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092

Chattaway, M. A., Langridge, G. C., & Wain, J. (2021). *Salmonella* nomenclature in the genomic era: a time for change. *Scientific Reports*, *11*(1), 7494. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86243-w

Chen, H., & Skylaris, C.-K. (2021). Analysis of DNA interactions and GC content with energy decomposition in large-scale quantum mechanical calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *23*(14), 8891–8899. https://doi.org/10.1039/D0CP06630C

Chen, Z., Grim, C. J., Ramachandran, P., & Meng, J. (2024). Advancing metagenome-assembled genome-based pathogen identification: unraveling the power of long-read assembly algorithms in Oxford Nanopore sequencing. *Microbiology Spectrum*, *12*(6). https://doi.org/10.1128/spectrum.00117-24

Chevez, Z. R., Dunn, L. L., da Silva, A. & Rodrigues, C. (2024). Prevalence of STEC virulence markers and *Salmonella* as a function of abiotic factors in agricultural water in the southeastern United States. *Frontiers in Microbiology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1320168

Chubiz, L. M. (2023). The Mar, Sox, and Rob Systems. *EcoSal Plus*, *11*(1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2022

Clasen, S. J., Bell, M. E. W., Borbón, A., Lee, D.-H., Henseler, Z. M., de la Cuesta-Zuluaga, J., Parys, K., Zou, J., Wang, Y., Altmannova, V., Youngblut, N. D., Weir, J. R., Gewirtz, A. T., Belkhadir, Y., & Ley, R. E. (2023). Silent recognition of flagellins from human gut commensal bacteria by Toll-like receptor 5. *Science Immunology*, *8*(79). https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abq7001

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2024). *CLSI M100-ED35:2025 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 35th Edition*. https://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED35:2025&sbssok=CLSI%20M100%20ED35:2025%20TABLE%201A-2

Cui, L., Wang, X., Zhao, Y., Peng, Z., Gao, P., Cao, Z., Feng, J., Zhang, F., Guo, K., Wu, M., Chen, H., & Dai, M. (2021). Virulence Comparison of *Salmonella enterica* Subsp. *enterica* Isolates from Chicken and Whole Genome Analysis of the High Virulent Strain *S.* Enteritidis 211. *Microorganisms*, *9*(11), 2239. https://doi.org/10.3390/microorganisms9112239

Diarra, B., Guindo, I., Koné, B., Dembélé, M., Cissé, I., Thiam, S., Konaté, K., Tékété, M., Maïga, A., Maïga, O., Timbiné, L., & Djimde, A. (2024). High frequency of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* causing diarrheal diseases at the Yirimadio community health facility, Mali. *BMC Microbiology*, *24*(1), 35. https://doi.org/10.1186/s12866-024-03198-4

Dörr, T. (2021). Understanding tolerance to cell wall–active antibiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1496*(1), 35–58. https://doi.org/10.1111/nyas.14541

El-Demerdash, A. S., Kamel, S. A., Elariny, E. Y. T., Henidi, H., Mahran, Y., Alahdal, H., Saleh, A. M., & Ibrahim, R. A. (2024). Natural Inhibitors of *Salmonella* MDR Efflux Pumps AcrAB and AcrD: An Integrated In Silico, Molecular, and In Vitro Investigation. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(23), 12949. https://doi.org/10.3390/ijms252312949

El-Saeed, B. A., Elshebrawy, H. A., Zakaria, A. I., Abdelkhalek, A., Imre, K., Morar, A., Herman, V., & Sallam, K. I. (2024). Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* and Other Gram-Negative Species Isolated from Native Egyptian Chicken Carcasses. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *9*(9), 217. https://doi.org/10.3390/tropicalmed9090217

Eren, K., Taktakoglu, N., & Pirim, I. (2023). DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine*, *54*(Supp1), S47–S56. https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280

Evangelopoulou, G., Burriel, A. R., & Solomakos, N. (2024). Distinctive Culture Expressions of Enterobacteria Interfering with Isolation of *Salmonella* spp. during the Application of the Recommended ISO 6579-1:2017. *Applied Sciences*, *14*(3), 953. https://doi.org/10.3390/app14030953

Fatima, A., Saleem, M., Nawaz, S., Khalid, L., Riaz, S., & Sajid, I. (2023). Prevalence and antibiotics resistance status of *Salmonella* in raw meat consumed in various areas of Lahore, Pakistan. *Scientific Reports*, *13*(1), 22205. https://doi.org/10.1038/s41598-023-49487-2

Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial

resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, *8*(1). https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748

Fu, Y., M'ikanatha, N. M., Lorch, J. M., Blehert, D. S., Berlowski-Zier, B., Whitehouse, C. A., Li, S., Deng, X., Smith, J. C., Shariat, N. W., Nawrocki, E. M., & Dudley, E. G. (2022). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Wild Birds in the United States Represent Distinct Lineages Defined by Bird Type. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(6). https://doi.org/10.1128/aem.01979-21

Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Marrufo, G., Astiazaran-Garcia, H., Ochoa-Zarzosa, A., Canett-Romero, R., García-Galaz, A., Torres-Vega, C., & Vázquez-Garcidueñas, M. S. (2023). Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains isolated from food. *Microbes and Infection*, *25*(1–2), 105019. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105019

Grant, J. R., Enns, E., Marinier, E., Mandal, A., Herman, E. K., Chen, C., Graham, M., Van Domselaar, G., & Stothard, P. (2023). Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, *51*(W1), W484–W492. https://doi.org/10.1093/nar/gkad326

Grivokostopoulos, N. C., Makariti, I. P., Hilaj, N., Apostolidou, Z., & Skandamis, P. N. (2022). Internalization of *Salmonella* in Leafy Greens and Impact on Acid Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, *88*(6). https://doi.org/10.1128/aem.02249-21

Gu, G., Strawn, L. K., Ottesen, A. R., Ramachandran, P., Reed, E. A., Zheng, J., Boyer, R. R., & Rideout, S. L. (2021). Correlation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in Irrigation Water to Environmental Factors, Fecal Indicators, and Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.557289

Hafezi, A., & Khamar, Z. (2024). The Method and Analysis of Some Biochemical Tests Commonly Used for Microbial Identification: A Review. *Comprehensive Health and Biomedical Studies*, *3*(2). https://doi.org/10.5812/chbs-160199

Han, J., Tang, H., Zhao, S., & Foley, S. L. (2024). *Salmonella enterica* virulence databases and bioinformatic analysis tools development. *Scientific Reports*, *14*(1), 25228. https://doi.org/10.1038/s41598-024-74124-x

Hardiati, A., Safika, S., Pasaribu, F. H., & Wibawan, I. W. T. (2022). Multidrug-resistant *Salmonella* sp. isolated from several chicken farms in West Java, Indonesia. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, *16*(1), 6–11. https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v16i1.18944

Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, J. S., & McLachlan, J. B. (2021). *Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622

Heffernan, L. M., Lawrence, A.-L. E., Marcotte, H. A., Sharma, A., Jenkins, A. X., Iguwe, D., Rood, J., Herke, S. W., O'Riordan, M. X., & Abuaita, B. H. (2024). Heterogeneity of *Salmonella enterica* lipopolysaccharide counteracts macrophage and antimicrobial peptide defenses. *Infection and Immunity*, *92*(10). https://doi.org/10.1128/iai.00251-24

Hilt, E. E., & Ferrieri, P. (2022). Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes*, *13*(9), 1566. https://doi.org/10.3390/genes13091566

Hong, Y.-P., Chen, B.-H., Wang, Y.-W., Teng, R.-H., Wei, H.-L., & Chiou, C.-S. (2024). The usefulness of nanopore sequencing in whole-genome sequencing-based genotyping of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology Spectrum*, *12*(7). https://doi.org/10.1128/spectrum.00509-24

Huang, L., Wu, C., Gao, H., Xu, C., Dai, M., Huang, L., Hao, H., Wang, X., & Cheng, G. (2022). Bacterial Multidrug Efflux Pumps at the Frontline of Antimicrobial Resistance: An Overview. *Antibiotics*, *11*(4), 520. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040520

Hussain, S., Ouyang, P., Zhu, Y., Khalique, A., He, C., Liang, X., Shu, G., & Yin, L. (2021). Type 3 secretion system 1 of *Salmonella* typhimurium and its inhibitors: a novel strategy to combat salmonellosis. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*(26), 34154–34166. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13986-4

International Organization for Standardization (ISO). (2017). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. *(ISO 6579-1:2017)*. ISO. https://www.iso.org/standard/56712.html

Izah, S. C., & Ogwu, M. C. (2025). Modeling solutions for microbial water contamination in the global south for public health protection. *Frontiers in Microbiology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1504829

Jeong, J., Chae, M., Kang, M.-S., Lee, J.-Y., Kwon, Y.-K., Lee, H.-J., Lee, S.-H., Son, H.-B., Moon, J.-S., & Cho, S. (2025). Emergence and characteristics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis harboring the pESI plasmid in chicken slaughterhouses in South Korea. *Microbiology Spectrum*, *13*(7). https://doi.org/10.1128/spectrum.02955-24

Jerez, S. A., Mora, A. Y., Millanao, A. R., Saavedra, C. P., Bucarey, S. A., Mora, G. C., Villagra, N. A., & Hidalgo, A. A. (2024). Transcriptional regulator MarT negatively regulates MarT-regulated motility gene I, a new gene involved in invasion and virulence of *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1430982

Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE*, *9*(8), e104984. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984

Kim, S. I., Kim, E., & Yoon, H. (2021). σS-Mediated Stress Response Induced by Outer Membrane Perturbation Dampens Virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750940

Kim, S.-H., Han, J. M., Cho, G.-S., Brinks, E., Franz, C. M. A. P., & Park, M.-K. (2025). Draft genome sequences of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolates from fresh produce and agricultural environments in South Korea. *BMC Research Notes*, *18*(1), 428. https://doi.org/10.1186/s13104-025-07494-8

Kowalska, B. (2023). Fresh vegetables and fruit as a source of *Salmonella* bacteria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *30*(1), 9–14. https://doi.org/10.26444/aaem/156765

Lamas, A., Garrido-Maestu, A., Prieto, A., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2023). Whole genome sequencing in the palm of your hand: how to implement a MinION Galaxy-based workflow in a food safety laboratory for rapid *Salmonella* spp. serotyping, virulence, and antimicrobial resistance gene identification. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1254692

Lawrence, A.-L. E., Abuaita, B. H., Berger, R. P., Hill, D. R., Huang, S., Yadagiri, V. K., Bons, B., Fields, C., Wobus, C. E., Spence, J. R., Young, V. B., & O'Riordan, M. X. (2021). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SPI-1 and SPI-2 Shape the Global Transcriptional Landscape in a Human Intestinal Organoid Model System. *MBio*, *12*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00399-21

Lee, Y.-S., Joung, S.-H., Park, Y., Kim, S. H., Kim, S. H., Joo, I., & An, E. S. (2025). Evaluation of an alternative positive control strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium for microbial assays. *PLOS One*, *20*(8), e0329363. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0329363

Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, *52*(W1), W78–W82. https://doi.org/10.1093/nar/gkae268

Li, M., Feng, X., Jian, Q., Jing, M., Wang, X., Cui, Z., Zhang, R., Sun, J., Liu, Y., Liao, X., & Lian, X. (2025). Plasmid pHXY0908 confers ciprofloxacin heteroresistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 by regulating efflux pump gene expression. *BMC Microbiology*, *25*(1), 661. https://doi.org/10.1186/s12866-025-04386-6

Li, S., Liu, H., & Qiu, J. (2025). Emerging insights into the type I secretion system: a key player in *Salmonella* virulence and host-pathogen interactions. *MBio*, *16*(11). https://doi.org/10.1128/mbio.01655-25

Liao, Y.-S., Lauderdale, T.-L., Chang, J.-H., Liang, S.-Y., Tsao, C.-S., Wei, H. L., Wang, Y.-W., Teng, R.-H., Hong, Y.-P., Chen, B.-H., & Chiou, C.-S. (2024). Epidemiological trends in serotypes distribution and antimicrobial resistance in *Salmonella* from humans in Taiwan, 2004-2022. *IJID Regions*, *11*, 100372. https://doi.org/10.1016/j.ijregi.2024.100372

Lim, Y. C., Ong, K. H., Khor, W. C., Chua, F. Y. X., Lim, J. Q., Tan, L. K., Chen, S. L., Wong, W. K., Maiwald, M., Barkham, T., Koh, T. H., Khoo, J., Chan, J. S. H., & Aung, K. T. (2024). Sequence Types and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Typhimurium in the Food Chain in Singapore. *Microorganisms*, *12*(9), 1912. https://doi.org/10.3390/microorganisms12091912

Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors*, *11*(7), 214. https://doi.org/10.3390/bios11070214

Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E. (2022). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *77*(3), 556–567. https://doi.org/10.1093/jac/dkab450

Liu, W., Huang, Y., Zhang, H., Liu, Z., Huan, Q., Xiao, X., & Wang, Z. (2023). Factors and Mechanisms Influencing Conjugation In Vivo in the Gastrointestinal Tract Environment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5919. https://doi.org/10.3390/ijms24065919

Liu, X., Yao, H., Zhao, X., & Ge, C. (2023). Biofilm Formation and Control of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Molecules*, *28*(6), 2432. https://doi.org/10.3390/molecules28062432

Luan, T., Commichaux, S., Hoffmann, M., Jayeola, V., Jang, J. H., Pop, M., Rand, H., & Luo, Y. (2024). Benchmarking short and long read polishing tools for nanopore assemblies: achieving near-perfect genomes for outbreak isolates. *BMC Genomics*, *25*(1), 679. https://doi.org/10.1186/s12864-024-10582-x

Manesh, A., Meltzer, E., Jin, C., Britto, C., Deodhar, D., Radha, S., Schwartz, E., & Rupali, P. (2021). Typhoid and paratyphoid fever: a clinical seminar. *Journal of Travel Medicine*, *28*(3). https://doi.org/10.1093/jtm/taab012

Mejía, L., Medina, J. L., Bayas, R., Salazar, C. S., Villavicencio, F., Zapata, S., Matheu, J., Wagenaar, J. A., González-Candelas, F., & Vinueza-Burgos, C. (2020). Genomic Epidemiology of *Salmonella* Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891

Meradji, S., Basher, N. S., Sassi, A., Ibrahim, N. A., Idres, T., & Touati, A. (2025). The Role of Water as a Reservoir for Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antibiotics*, *14*(8), 763. https://doi.org/10.3390/antibiotics14080763

Mey, A. R., Gómez-Garzón, C., & Payne, S. M. (2021). Iron Transport and Metabolism in *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, *9*(2). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2020

Mikołajczyk, M., Złotkowska, D., & Mikołajczyk, A. (2024). Impact on Human Health of *Salmonella* spp. and Their Lipopolysaccharides: Possible Therapeutic Role and Asymptomatic Presence Consequences. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(22), 11868. https://doi.org/10.3390/ijms252211868

Minamino, T., & Kinoshita, M. (2023). Structure, Assembly, and Function of Flagella Responsible for Bacterial Locomotion. *EcoSal Plus*, *11*(1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0011-2023

Ministerio de Agricultura, G. y P. (2024). *Proyecto de Irrigación Tecnificada a usuarios de juntas de riego de Tungurahua*. https://www.agricultura.gob.ec/socializan-proyecto-de-irrigacion-tecnificada-a-usuarios-de-juntas-de-riego-de-tungurahua/

Mkangara, M. (2023). Prevention and Control of Human *Salmonella enterica* Infections: An Implication in Food Safety. *International Journal of Food Science*, *2023*, 1–26. https://doi.org/10.1155/2023/8899596

Mohamedtahir Fadlalla, I. (2025). Perspective Chapter: One Health Approach Impact in *Salmonella* Public Health – Nexus with Molecular Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In *Salmonella - Molecular Biology, Pathogenesis, and Public Health Impact [Working Title]*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.1011603

Mohammed, B. T. (2022). Identification and bioinformatic analysis of invA gene of *Salmonella* in free range chicken. *Brazilian Journal of Biology*, *84*, e263363. https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1519-6984.263363

Montoro-Dasi, L., Lorenzo-Rebenaque, L., Marco-Fuertes, A., Vega, S., & Marin, C. (2023). Holistic Strategies to Control *Salmonella* Infantis: An Emerging Challenge in the European Broiler Sector. *Microorganisms*, *11*(7), 1765. https://doi.org/10.3390/microorganisms11071765

Nakamura, S., & Minamino, T. (2024). Structure and Dynamics of the Bacterial Flagellar Motor Complex. *Biomolecules*, *14*(12), 1488. https://doi.org/10.3390/biom14121488

Neyaz, L. A., Alghamdi, H. S., Alghashmari, R. M., Alswat, S. S., Almaghrabi, R. O., Bazaid, F. S., Albarakaty, F. M., Elbanna, K., & Abulreesh, H. H. (2024). A comprehensive review on the current status of culture media for routine standardized isolation of *Salmonella* and *Shigella* spp. from contaminated food. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*. https://doi.org/10.1007/s43994-024-00205-2

Nissa Maulia Bestari, Adiana Mutamsari Witaningrum, Dadik Rahadrjo, Viski Fitri Hendrawan, Widjiati Widjiati, Epy Muhammad Luqman, & Wiwiek Tyasningsih. (2025). Detection *Salmonella* sp. from swab clooca of broiler chicken at Keputran market, Surabaya Indonesia. *Open Access Research Journal of Biology and Pharmacy*, *13*(1), 021–029. https://doi.org/10.53022/oarjbp.2025.13.1.0016

Ochoa-Avilés, A., Escandón, S., Ochoa-Avilés, C., Heredia-Andino, O., & Ortiz-Ulloa, J. (2024). Incidence of foodborne diseases in Ecuador. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 273–280. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2024.413.13456

Oladeinde, A., Abdo, Z., Press, M. O., Cook, K., Cox, N. A., Zwirzitz, B., Woyda, R., Lakin, S. M., Thomas, J. C., Looft, T., Cosby, D. E., Hinton, A., Guard, J., Line, E., Rothrock, M. J., Berrang, M. E., Herrington, K., Zock, G., Plumblee Lawrence, J., … Ritz, C. (2021). Horizontal Gene Transfer Is the Main Driver of Antimicrobial Resistance in Broiler Chicks Infected with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *MSystems*, *6*(4). https://doi.org/10.1128/msystems.00729-21

Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., … Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D678–D689. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003

Oludairo, O., Kwaga, J., Kabir, J., Abdu, P., Gitanjali, A., Perets, A., Cibin, V., Lettini, A., & Aiyedun, J. (2022). A review of the International Organization for Standardization

(ISO) guidelines for the detection of *Salmonella* from faeces. *Journal of Applied Veterinary Sciences*, *0*(0), 0–0. https://doi.org/10.21608/javs.2022.146858.1158

Oludairo, O., Kwaga, J., Kabir, J., Abdu, P., Gitanjali, A., Perrets, A., Cibin, V., Lettini, A., & Aiyedun, J. (2022). Review of *Salmonella* Characteristics, History, Taxonomy, Nomenclature, Non Typhoidal Salmonellosis (NTS) and Typhoidal Salmonellosis (TS). *Zagazig Veterinary Journal*, *50*(2), 160–171. https://doi.org/10.21608/zvjz.2022.137946.1179

Omega Biotek. (2025). *E.Z.N.A.® Soil DNA Kit.*

Onifade, O., Lawal, Z. K., Shamsuddin, N., Abas, P. E., Lai, D. T. C., & Gödeke, S. H. (2025). Impact of Seasonal Variation and Population Growth on Coliform Bacteria Concentrations in the Brunei River: A Temporal Analysis with Future Projection. *Water*, *17*(7), 1069. https://doi.org/10.3390/w17071069

Oxford Nanopore Technologie. (2024). *Ligation sequencing gDNA - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24).*

Patwekar, M., Patwekar, F., Badarinath, A. V., Billah, A. A. M., Gorijavolu, V., Krishnan, K., Shanmugasundaram, P., Prasad, P. D., & Kazi, A. A. (2025). Genomic Sequencing: Techniques, Advancements, and the Path Ahead. *Journal of Bio-X Research*, *8*. https://doi.org/10.34133/jbioxresearch.0046

Perez-Sepulveda, B. M., & Hinton, J. C. D. (2025). Microbe Profile: *Salmonella* Typhimurium: the master of the art of adaptation. *Microbiology*, *171*(1). https://doi.org/10.1099/mic.0.001521

Peruzy, M. F., La Tela, I., Carullo, M. R., Ioele, S., Proroga, Y. T. R., Balestrieri, A., & Murru, N. (2023). Occurrence and distribution of *Salmonella* serovars associated with human infection isolated from irrigation waters and food-producing animals in southern Italy: eleven-year monitoring (2011-2021). *Italian Journal of Food Safety*. https://doi.org/10.4081/ijfs.2023.11538

Punchihewage-Don, A. J., Ranaweera, P. N., & Parveen, S. (2024). Defense mechanisms of *Salmonella* against antibiotics: a review. *Frontiers in Antibiotics*, *3*. https://doi.org/10.3389/frabi.2024.1448796

Reyes, M. S. G., Palharini, R. S. A., Monteiro, F. F., Ayala, S., & Undurraga, E. A. (2025). Prevalence and Distribution of *Salmonella* in Water Bodies in South America: A Systematic Review. *Microorganisms*, *13*(3), 489. https://doi.org/10.3390/microorganisms13030489

Ricci, V., Kaur, J., Stone, J., & Piddock, L. J. V. (2023). Antibiotics do not induce expression of *acrAB* directly but via a RamA-dependent pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *67*(11). https://doi.org/10.1128/aac.00620-23

Robi, D. T., Mossie, T., & Temteme, S. (2024). A Comprehensive Review of the Common Bacterial Infections in Dairy Calves and Advanced Strategies for Health Management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, *Volume 15*, 1–14. https://doi.org/10.2147/VMRR.S452925

Rocha, A. D. de L., Ferrari, R. G., Pereira, W. E., Lima, L. A. de, Givisiez, P. E. N., Moreno-Switt, A. I., Toro, M., Delgado-Suárez, E. J., Meng, J., & Oliveira, C. J. B. de. (2022). Revisiting the Biological Behavior of *Salmonella enterica* in Hydric Resources: A Meta-Analysis Study Addressing the Critical Role of Environmental Water on Food Safety and Public Health. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.802625

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, *12*(7), 997. https://doi.org/10.3390/biology12070997

Islam, M. S., Islam, M. R., Rahman, M. T., Habiba, M. U., Rahman, M. N., & Halima, O. (2021). Linking between contamination of environmental water and *Salmonella* foodborne illness: A review. *Indian Journal of Public Health Research & Development*. https://doi.org/10.37506/ijphrd.v12i1.13870

Scarano, C., Veneruso, I., De Simone, R. R., Di Bonito, G., Secondino, A., & D'Argenio, V. (2024). The Third-Generation Sequencing Challenge: Novel Insights for the Omic Sciences. *Biomolecules*, *14*(5), 568. https://doi.org/10.3390/biom14050568

Shaji, S., Selvaraj, R. K., & Shanmugasundaram, R. (2023). *Salmonella* Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies. *Microorganisms*, *11*(11), 2814. https://doi.org/10.3390/microorganisms11112814

Sharma, M., Handy, E. T., East, C. L., Kim, S., Jiang, C., Callahan, M. T., Allard, S. M., Micallef, S., Craighead, S., Anderson-Coughlin, B., Gartley, S., Vanore, A., Kniel, K. E., Haymaker, J., Duncan, R., Foust, D., White, C., Taabodi, M., Hashem, F., … Sapkota, A. R. (2020). Prevalence of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in non-traditional irrigation waters in the Mid-Atlantic United States is affected by water type, season, and recovery method. *PLOS ONE*, *15*(3), e0229365. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229365

Sheka, D., Alabi, N., & Gordon, P. M. K. (2021). Oxford nanopore sequencing in clinical microbiology and infection diagnostics. *Briefings in Bioinformatics*, *22*(5). https://doi.org/10.1093/bib/bbaa403

Sia, C. M., Pearson, J. S., Howden, B. P., Williamson, D. A., & Ingle, D. J. (2025). *Salmonella* pathogenicity islands in the genomic era. *Trends in Microbiology*, *33*(7), 752–764. https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.02.007

Siceloff, A. T., Ohta, N., Norman, K. N., Loneragan, G. H., Norby, B., Scott, H. M., & Shariat, N. W. (2021). Antimicrobial Resistance Hidden within Multiserovar *Salmonella* Populations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(6). https://doi.org/10.1128/AAC.00048-21

Sigova, E. A., Pushkova, E. N., Rozhmina, T. A., Kudryavtseva, L. P., Zhuchenko, A. A., Novakovskiy, R. O., Zhernova, D. A., Povkhova, L. V., Turba, A. A., Borkhert, E. V., Melnikova, N. V., Dmitriev, A. A., & Dvorianinova, E. M. (2023). Assembling Quality Genomes of Flax Fungal Pathogens from Oxford Nanopore Technologies Data. *Journal of Fungi*, *9*(3), 301. https://doi.org/10.3390/jof9030301

Srednik, M. E., Morningstar-Shaw, B. R., Hicks, J. A., Mackie, T. A., & Schlater, L. K. (2022). Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella enterica* serovar Senftenberg isolates in production animals from the United States. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.979790

Sun, J., Rutherford, S. T., Silhavy, T. J., & Huang, K. C. (2022). Physical properties of the bacterial outer membrane. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(4), 236–248. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00638-0

Tan, S. J., Nordin, S., Esah, E. M., & Mahror, N. (2022). *Salmonella* spp. in Chicken: Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Detection Methods. *Microbiology Research*, *13*(4), 691–705. https://doi.org/10.3390/microbiolres13040050

Tang, B., Elbediwi, M., Nambiar, R. B., Yang, H., Lin, J., & Yue, M. (2022). Genomic Characterization of Antimicrobial-Resistant *Salmonella enterica* in Duck, Chicken, and Pig Farms and Retail Markets in Eastern China. *Microbiology Spectrum*, *10*(5). https://doi.org/10.1128/spectrum.01257-22

Toyting, J., Nuanmuang, N., Utrarachkij, F., Supha, N., Thongpanich, Y., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., Sato, T., Thapa, J., Nakajima, C., & Suzuki, Y. (2024). Genomic analysis of *Salmonella* isolated from canal water in Bangkok, Thailand. *Microbiology Spectrum*, *12*(5). https://doi.org/10.1128/spectrum.04216-23

Vinueza-Burgos, C., Medina-Santana, J., Ishida, M., Sauders, B., Deiulio, G., Dickey, A., Endara, P., & Terán, R. (2025). *Salmonella* isolated from street foods and environment of an urban park: A whole genome sequencing approach. *PLOS ONE*, *20*(4), e0320735. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0320735

Wang, D., Su, Y., Gao, F., Guo, S., Yang, J., Wu, D., Jiang, Q., Chen, J., Sun, J., Fang, L., & Liao, X. (2025). Comparison of ST19 *Salmonella* Typhimurium and ST34 *Salmonella* I,4,[5],12:i:-: a trade-off between plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence. *LWT*, *225*, 117868. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2025.117868

Wick, R. R., Judd, L. M., & Holt, K. E. (2023). Assembling the perfect bacterial genome using Oxford Nanopore and Illumina sequencing. *PLOS Computational Biology*, *19*(3), e1010905. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010905

Wilairatana, P., Mala, W., Klangbud, W. K., Kotepui, K. U., Rattaprasert, P., & Kotepui, M. (2021). Prevalence, probability, and outcomes of typhoidal/non-typhoidal *Salmonella* and malaria co-infection among febrile patients: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *11*(1), 21889. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00611-0

Williams, A., Gaoh, S. D., Savenka, A., Paredes, A., Alusta, P., Ahn, Y., & Buzatu, D. A. (2024). A flow cytometric assay to detect viability and persistence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes in nuclease-free water at 4 and 25° C. *Frontiers in*

Microbiology, *15*, 1342478. https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342478

Wishart, D. S., Han, S., Saha, S., Oler, E., Peters, H., Grant, J. R., Stothard, P., & Gautam, V. (2023). PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Research*, *51*(W1), W443–W450. https://doi.org/10.1093/nar/gkad382

World Health Organization (WHO). (2018). *Salmonella (non-typhoidal)*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)

World Health Organization (WHO). (2019). *Nontyphoidal Salmonella disease. WHO – Immunization, Vaccines and Biologicals.* https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/nontyphoidal-salmonella-disease

Worley, M. J. (2025). *Salmonella* Type III Secretion System Effectors. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(6), 2611. https://doi.org/10.3390/ijms26062611

Xu, B., Hou, Z., Liu, L., Yan, R., Zhang, J., Wei, J., Du, M., Xuan, Y., Fan, L., & Li, Z. (2023). The Resistance and Virulence Characteristics of *Salmonella* Enteritidis Strain Isolated from Patients with Food Poisoning Based on the Whole-Genome Sequencing and Quantitative Proteomic Analysis. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 16*, 6567–6586. https://doi.org/10.2147/IDR.S411125

Xu, F., Ge, C., Luo, H., Li, S., Wiedmann, M., Deng, X., Zhang, G., Stevenson, A., Baker, R. C., & Tang, S. (2020). Evaluation of real-time nanopore sequencing for *Salmonella* serotype prediction. *Food Microbiology*, *89*, 103452. https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103452

Yan, S., Jiang, Z., Zhang, W., Liu, Z., Dong, X., Li, D., Liu, Z., Li, C., Liu, X., & Zhu, L. (2023). Genomes-based MLST, cgMLST, wgMLST and SNP analysis of *Salmonella* Typhimurium from animals and humans. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *96*, 101973. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.101973

Yan, S., Zhang, W., Li, C., Liu, X., Zhu, L., Chen, L., & Yang, B. (2021). Serotyping, MLST, and Core Genome MLST Analysis of *Salmonella enterica* From Different Sources in China During 2004–2019. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.688614

Yin, L., Dai, Y., Chen, H., He, X., Ouyang, P., Huang, X., Sun, X., Ai, Y., Lai, S., Zhu, L., & Xu, Z. (2022). Cinnamaldehyde Resist *Salmonella* Typhimurium Adhesion by Inhibiting Type I Fimbriae. *Molecules*, *27*(22), 7753. https://doi.org/10.3390/molecules27227753

Zhao, W., Zeng, W., Pang, B., Luo, M., Peng, Y., Xu, J., Kan, B., Li, Z., & Lu, X. (2023). Oxford nanopore long-read sequencing enables the generation of complete bacterial and plasmid genomes without short-read sequencing. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1179966

ANEXOS

Anexo 1

Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas aisladas en cada punto muestreado del canal.

Punto	Cepa	TSI K= alcalino (rojo) A= acido amarillo	Citrato (Simmons)	Urea	Rojo de Metilo
1	-	-	-	-	-
2	S.A.2.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.2.2	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.2.3	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.2.4	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.2.5	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.2.6	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
3	S.A.3.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.3.2	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.3.3	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
4	S.A.4.2	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.4.3	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)

Continúa

Anexo 1

Resultados de pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas aisladas en cada punto muestreado del canal.

Punto	Cepa	TSI K= alcalino (rojo) A= acido amarillo	Citrato (Simmons)	Urea	Rojo de Metilo
5	S.A.5.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
6	S.A.6.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.6.2	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.6.3	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.6.4	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
7	S.A.7.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.7.2	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.7.3	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.7.4	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
	S.A.7.5	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)
8	-	-	-	(-)	-
9	-	-	-	(-)	-
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	S.A.12.1	K/A +H_2S + Gas	(+)	(-)	(+)