



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Identificación de marcadores moleculares para la
detección de bacterias patógenas del género
Pseudomonas y *Salmonella* en aves de corral.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

Biol. Lázaro Raúl Del Busto Benítez

DIRECTOR: DR. EDGAR DANTAN GONZÁLEZ

**CODIRECTOR: DR. ARMANDO HERNÁNDEZ
MENDOZA**



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2025

| ÍNDICE GENERAL | Pág. |
|---|-------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1 <i>Importancia de la industria avícola: Los microorganismos como uno de los principales desafíos</i> | 4 |
| 2.2 <i>Distribución de Salmonella y Pseudomonas</i> | 6 |
| 2.3 <i>Interacción huésped – hospedero. Factores de patogenicidad y respuesta del hospedero</i> | 9 |
| 2.3.1 <i>Salmonella Gallinarum/Pullorum</i> | 9 |
| 2.3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 12 |
| 2.4 <i>Resistencia a antibióticos, Pseudomonas aeruginosa</i> | 14 |
| 2.5 <i>Ensayos diagnósticos (Pruebas inmunológicas)</i> | 16 |
| 2.5.1 <i>Técnicas de PCR para la identificación</i> | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. HIPÓTESIS | 20 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 20 |
| 5.1 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i> | 20 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| 6.1 <i>Creación de la base de datos</i> | 21 |
| 6.2 <i>Análisis taxonómicos</i> | 22 |
| 6.3 <i>Genómica comparativa</i> | 23 |
| 6.4 <i>Identificación de los marcadores moleculares</i> | 24 |
| 7. RESULTADOS | 25 |
| 7.1 <i>Creación de una base de datos para Pseudomonas aeruginosa, Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum</i> | 25 |
| 7.2 <i>Anotación del genoma</i> | 31 |
| 7.3 <i>Genómica comparativa</i> | 36 |
| 7.3.1 <i>Pangenoma de Pseudomonas aeruginosa</i> | 36 |
| 7.3.2 <i>Pangenoma Salmonella gallinarum y Salmonella pullorum</i> | 39 |
| 7.3.3 <i>Blast en CGview</i> | 40 |
| 7.4 <i>Análisis taxonómicos</i> | 42 |

| | |
|---|----|
| 7.4 Identificación de candidatos a marcadores moleculares | 44 |
| 8. DISCUSIÓN | 48 |
| 9. CONCLUSIONES | 54 |
| 10. PERSPECTIVAS | 55 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |

| ÍNDICE DE FIGURAS | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Distribución mundial de <i>P. aeruginosa</i> creada a partir de los reportes de localización geográfica para cada genoma | 7 |
| Figura 2. Países donde se reportó la presencia de Tifosis Aviar en el período de 2016-2021 | 8 |
| Figura 3. Localización de los genes de virulencia en el genoma de <i>Salmonella</i> . | 12 |
| Figura 4. Promedio de GC % para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella Gallinarum</i> y <i>Salmonella Pullorum</i> | 29 |
| Figura 5. Visualización en la terminal Linux de los archivos de salida del programa CheckM en texto plano simple (nohup). | 30 |
| Figura 6. Mapa circular del genoma de <i>Salmonella spp.</i> generado mediante herramientas de anotación genómica. | 31 |
| Figura 7. Comparación de las principales características genómicas anotadas en cepas de <i>Salmonella Gallinarum</i> y <i>Salmonella Pullorum</i> . | 33 |
| Figura 8. Promedio de elementos genómicos anotados en cepas de <i>P. aeruginosa</i> | 34 |
| Figura 9. Mapa circular del genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa PAO1. | 35 |

| | |
|--|----|
| Figura 10. Distribución genómica de genes relacionados con resistencia antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i> . | 36 |
| Figura 11. Distribución del pangenoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a partir del análisis de 1193 cepas. | 37 |
| Figura 12. Visualización en phandango de datos pangenómicos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> combinado con dendograma obtenido a partir de presencia o ausencia de genes. | 38 |
| Figura 13. Pangenoma de los serotipos <i>Salmonella Gallinarum</i> y <i>Salmonella Pullorum</i> | 39 |
| Figura 14. Visualización en phandango de datos pangenómicos de <i>Salmonella Gallinarum</i> y <i>Salmonella Pullorum</i> combinado con dendograma obtenido a partir de presencia o ausencia de genes | 40 |
| Figura 15. Genómica comparativa de <i>Salmonella gallinarum</i> (color verde) y <i>Salmonella Pullorum</i> (color azul) mediante visualización circular en el CGview. | 41 |
| Figura 16. Anotación de la región ausente en <i>Salmonella Pullorum</i> . | 42 |
| Figura 17. Cofilogenia basada en 250 genomas de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovares <i>Gallinarum</i> y <i>Pullorum</i> . | 43 |
| Figura 18. Resultados del alineamiento in silico del gen <i>potE</i> (BBOLJJI_01219) contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. | 45 |
| Figura 19. Resultados del alineamiento in silico del gen NADH oxidasa contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. | 46 |
| Figura 20. Resultados del alineamiento in silico del gen <i>FtsZ</i> contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. | 46 |
| Figura 21. Representación esquemática de la región genómica diferencial identificada en <i>Salmonella Gallinarum</i> . | 47 |

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Estadísticas económico de la producción pecuaria y avícola en México | 5 |
| Tabla 2. Características de las Islas de Patogenicidad de <i>Salmonella</i> . | 9 |
| Tabla 3. Factores de patogenicidad de <i>P. aeruginosa</i> . | 13 |
| Tabla 4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 15 |
| Tabla 5. Cantidad de genomas totales reportados para ambos géneros en el NCBI hasta el 1 de abril del 2024. | 26 |
| Tabla 6. Cantidad de genomas totales reportados para ambos géneros en el NCBI hasta el 13 de mayo del 2024. | 26 |
| Tabla 7. Representación de solo 10 genomas de las tablas de características | 28 |

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Estudios Ecogenómicos del Centro de Investigación en Biotecnología y BIOGENEV del Centro de Investigación en Dinámica Celular



Contó con la asignación de la beca al CVU: 1321826 por parte de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) ahora Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti).

Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación



Agradecimientos académicos

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento al **Dr. Edgar Dantán González**, por la confianza depositada en mí para llevar a cabo el presente proyecto de investigación. Así mismo, le agradezco profundamente por abrirme las puertas de su laboratorio y por su apoyo constante a lo largo de todo el proceso.

De igual manera, agradezco al **Dr. Armando Hernández Mendoza** por aceptarme como su estudiante y por la cálida bienvenida que me brindó en su laboratorio. Confieso que nunca sentí que me encontraba realizando una estancia académica; por el contrario, desde el primer instante me sentí parte del equipo, lo cual hizo de esta experiencia un proceso sumamente enriquecedor y motivador.

Agradezco también al **Dr. Fernando Martínez Ocampo** por su orientación y apoyo en el área de la bioinformática y la programación, disciplinas que inicialmente representaban un campo completamente ajeno para mí.

A los miembros de mi comité tutorial **Dr. Ramón Suarez** y el **Dr. Víctor Manuel Hernández** por su orientación, sus críticas constructivas y sus valiosas observaciones en cada etapa del proceso, las cuales fueron esenciales para la correcta elaboración y consolidación del presente trabajo de investigación.

A las doctoras miembros del Laboratorio de Estudios Ecogenómicos **Rosalba Salgado**, **Janette Onofre**, y **Gloria Sarahi Castañeda**, por sus valiosas observaciones, comentarios y sugerencias realizadas durante las distintas ocasiones en que el proyecto fue presentado en los seminarios del grupo, las cuales contribuyeron de manera significativa al fortalecimiento y mejora del presente trabajo de investigación.

Agradecimientos familiares

Soy del convencimiento de que cada meta alcanzada representa una bendición; sin embargo, considero que la mayor bendición de mi vida no es una meta lograda ni una por lograr, sino **mis padres**. Sin ellos, nada de lo aquí presentado habría sido posible. Han sido mi guía desde el primer momento y el principal motor impulsor en mi desarrollo académico, personal y humano. A ellos, mi más profundo agradecimiento, pues su apoyo, ejemplo y entrega han sido fundamentales en cada etapa de mi vida.

A mi hermano, le agradezco por ser la alegría de nuestro hogar y por su apoyo incondicional en todos los aspectos, sobre todo por ocuparse de nuestros padres en este tiempo que he estado lejos, por decirme: “tu sigue que aquí todo está bien”. Créeme que este logro también es tuyo.

A mi abuela que sigue estando presente en cada uno de los aspectos de mi vida. Me vio partir, dios no permitió que me viera regresar, pero lo que si estoy seguro es que ahora estaría mega orgullosa de mí.

A mi novia que ha sido un apoyo indispensable para mí en este proceso y me ha hecho sentir en todo momento que a pesar de no estoy en mi país no estoy solo

Al resto de la familia, que siempre ha estado pendiente de mí y también del desarrollo de este proyecto.

¡¡¡A todos muchas gracias!!!

Agradecimientos personales.

Deseo agradecer a todos mis amigos que, a pesar de la distancia, estuvieron presentes y acompañaron este proceso académico. En particular, agradezco a **Hansel Alfonso Martínez** y **Marlon Duvegel Pardo**, quienes en todo momento me estuvieron brindando palabras de ánimo y disposición para ayudar aun estando lejos.

Asimismo, durante mi estancia en México he tenido la oportunidad de formar valiosas amistades entre las cuales destaco a **Karla Mariana Martínez**, **David Fuentes** y **Aylin López**. Su compañerismo y apoyo contribuyeron a que me sintiera plenamente integrado y parte del grupo de trabajo del laboratorio BIOGENEV.

A todos los estudiantes del Laboratorio de Estudios Ecogenómicos por su compañerismo y apoyo.

RESUMEN

La industria avícola constituye uno de los sectores más relevantes de la producción pecuaria, aportando gran proporción de la proteína animal destinada al consumo humano y desempeñar un papel fundamental en la generación de empleo y el desarrollo económico. En México, este sector representa el principal motor de la producción pecuaria, con una contribución superior al 60 % del volumen nacional y una elevada producción de carne de pollo y huevo, lo que posiciona al país entre los mayores productores y consumidores a nivel mundial. Sin embargo, la industria avícola enfrenta importantes desafíos sanitarios asociados a bacterias patógenas que afectan la productividad, la seguridad alimentaria incluso la salud pública. Entre los agentes de mayor relevancia se encuentran *Salmonella enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum*, causantes de la tifosis aviar y la pullorosis respectivamente, así como *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista con elevada resistencia antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue identificar marcadores moleculares específicos que permitan la detección precisa de estas bacterias patógenas en aves de corral mediante enfoques genómicos comparativos.

Se analizaron 162 genomas de *Salmonella pullorum*, 88 genomas de *Salmonella gallinarum* y 1,193 genomas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de la base de datos del NCBI. Los genomas fueron validados mediante CheckM y QUAST y posteriormente anotados con Prokka. Se realizaron análisis filogenómicos, pangenómicos, empleando herramientas bioinformáticas como Roary, GET_HOMOLOGUES y GET_PHYLOMARKERS. El análisis pangenómico de *P. aeruginosa* reveló un pangenoma altamente abierto, con solo el 1.82% de genes pertenecientes al genoma central, lo que evidencia una elevada plasticidad genética. A partir del core genome se identificaron tres genes altamente conservadas y específicas de la especie, con potencial uso como marcadores moleculares. En el caso de *Salmonella*, la genómica comparativa permitió detectar una región genómica de aproximadamente 10 kb presente solo en *Salmonella gallinarum* por lo que resulta muy útil para la discriminación molecular entre ambos serotipos.

ABSTRACT

The poultry industry constitutes one of the most relevant sectors of livestock production, providing a large proportion of the animal protein intended for human consumption and playing a fundamental role in employment generation and economic development. In Mexico, this sector represents the main driver of livestock production, contributing more than 60% of the national output and maintaining high levels of poultry meat and egg production, positioning the country among the leading producers and consumers worldwide. However, the poultry industry faces significant sanitary challenges associated with pathogenic bacteria that affect productivity, food safety, and even public health. Among the most relevant agents are *Salmonella enterica* serovars *Gallinarum* and *Pullorum*, the causative agents of fowl typhoid and pullorum disease, respectively, as well as *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen with high antimicrobial resistance. The objective of this study was to identify specific molecular markers that allow the accurate detection of these pathogenic bacteria in poultry using comparative genomics approaches.

A total of 162 *Salmonella Pullorum* genomes, 88 *Salmonella Gallinarum* genomes, and 1,193 *Pseudomonas aeruginosa* genomes were analyzed from the NCBI database. Genome quality was assessed using CheckM and QUASt, and annotation was performed with Prokka. Phylogenomic and pangenomic analyses were carried out using bioinformatic tools such as Roary, GET_HOMOLOGUES, and GET_PHYLOMARKERS. The pangenomic analysis of *P. aeruginosa* revealed a highly open pangenome, with only 1.82% of genes belonging to the core genome, highlighting its high genetic plasticity. From the core genome, three highly conserved and species-specific genes were identified with potential use as molecular markers. In the case of *Salmonella*, comparative genomics allowed the identification of an approximately 10 kb genomic region present exclusively in *Salmonella Gallinarum*, making it highly useful for molecular discrimination between both serovars.

1. Introducción

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, dentro del filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria* y orden *Enterobacterales* (Grimont y Weill, 2007). Fue descrito originalmente a finales del siglo XIX y debe su nombre a Daniel Elmer Salmon, quien junto a Theobald Smith aisló por primera vez al agente en 1885. Tradicionalmente, el género se dividió en numerosas especies en función de sus características bioquímicas, pero estudios posteriores de hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes llevaron a una reorganización taxonómica más coherente. Actualmente se reconocen dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La primera es la más relevante desde el punto de vista clínico y veterinario, mientras que *S. bongori* se asocia principalmente a reptiles y rara vez a infecciones humanas (Brenner *et al.*, 2000; Gal-Mor *et al.*, 2014).

Para *S. enterica*, que abarca la gran mayoría de los serovares patógenos para aves y humanos, se han descrito seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Cada subespecie posee características epidemiológicas y ecológicas distintas. Mientras que *S. enterica* subsp. *enterica* se encuentra principalmente en aves y mamíferos, otras subespecies son más frecuentes en reptiles u otros ambientes. La subespecie *enterica* es de especial interés porque incluye a más del 99% de los aislamientos clínicos humanos y animales, entre los que destacan serovares de importancia en salud pública y veterinaria, como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* por citar algunas (Wales *et al.*, 2023).

La clasificación intraespecífica se realiza principalmente mediante el esquema Kauffmann-White-Le Minor, que establece la identificación de los serovares en base a sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y, en algunos casos, capsulares (Vi). Gracias a este sistema se han descrito más de 2,600 serovares hasta la fecha, lo que convierte a *Salmonella* en uno de los géneros bacterianos con mayor diversidad serológica conocida (Grimont y Weill, 2007). Es importante mencionar que, aunque más de 2.600 serotipos de *Salmonella* han sido identificados hasta la

fecha (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014), no todas son perjudiciales para la salud humana ya que algunos serotipos de *Salmonella* sólo son patógenos para huéspedes específicos. Por ejemplo, la *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum* están adaptadas particularmente a las aves y afectan principalmente a pollos y pavos pudiendo transmitirse tanto vertical como horizontalmente (Barrow y Freitas Neto, 2011, Lozica *et al.*, 2024). La transmisión horizontal entre las aves por contacto con heces contaminadas e incluso canibalismo es considerada una de las principales vías de diseminación de la enfermedad. Sin embargo, los efectos que pueden tener la presencia de huevos fértiles provenientes de gallinas reproductoras positivas para *Salmonella Gallinarum/Pullorum* son bastante negativos para el sector avícola. Se ha reportado que un 3% de huevos contaminados provenientes de reproductoras positivas pueden llegar a contaminar el 100% de los pollitos al momento de su nacimiento.

La tifosis aviar o fiebre tifoidea es una enfermedad que puede afectar a aves de todas las edades, aunque ocurre con mayor frecuencia en aquellas que son adultas, según múltiples reportes alcanza tasas de mortalidad de hasta el 90% en estos ejemplares (Shivaprasad *et al.*, 2013, Beyaz *et al.*, 2010). Esta enfermedad es causada específicamente por *Salmonella entérica serovar Gallinarum*, una bacteria Gram negativa e inmóvil que puede causar infecciones sistémicas graves denominadas septicémicas y altas tasas de morbilidad y mortalidad en aves susceptibles. Estudios experimentales recientes, como el de Ojima *et al.* 2021, confirman que la infección por *S. Gallinarum* desencadena respuestas inmunitarias intensas y lesiones multisistémicas que contribuyen a la alta mortalidad antes mencionada.

La pullorosis aviar es causada por *Salmonella enterica serovar Pullorum*, un patógeno Gram negativo, inmóvil, estrechamente relacionado con *S. Gallinarum*. A diferencia de esta última, que afecta con mayor frecuencia a aves adultas, la pullorosis se presenta principalmente en aves recién nacidas o en etapas tempranas de crecimiento (Barrow y Freitas Neto, 2011). Según Shivaprasad y Barrow 2013, la enfermedad se caracteriza por una septicemia aguda que provoca alta mortalidad

en los primeros días de vida, manifestándose clínicamente con letargo, anorexia, diarrea blanca característica y retraso en el desarrollo. Estudios experimentales han demostrado que *S. Pullorum* es capaz de transmitirse de manera vertical a través del huevo, lo que constituye un mecanismo fundamental en la diseminación de la enfermedad (Gast y Porter, 2020). Además, la transmisión horizontal mediante contacto directo, heces y equipos de granja contaminados también juega un papel importante en los brotes clínicos (EFSA, 2017).

Por otro lado, el género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, dentro del filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria* y orden *Pseudomonadales* (Peix *et al.*, 2009; Kothari *et al.*, 2022). Se trata de bacilos Gram negativos con forma recta o ligeramente curvada, aerobios y móviles gracias a la presencia de un flagelo polar. Aunque comúnmente se consideran bacterias aerobias estrictas, varias especies muestran un metabolismo flexible y pueden crecer en condiciones anaerobias utilizando nitrato o arginina en lugar de oxígeno como aceptores terminales de electrones, lo que justifica describirlas como aerobias facultativas (Wu *et al.*, 2015). En términos bioquímicos, la mayoría de los miembros del género son positivos para oxidasa y catalasa, lo que los distingue de otros géneros relacionados.

Taxonómicamente, *Pseudomonas* constituye un grupo muy diverso, con más de 200 especies descritas, muchas de ellas con gran versatilidad metabólica y capacidad de adaptación ambiental (Garrido-Sanz *et al.*, 2016; Peix *et al.*, 2018). Entre éstas, *Pseudomonas aeruginosa* destaca como la especie de mayor importancia médica y veterinaria. Se trata de un patógeno oportunista con un amplio rango de hospedadores, incluyendo al ser humano, animales domésticos y aves. En la patología aviar se ha documentado su implicación en septicemias, aerosaculitis, queratoconjuntivitis y procesos reproductivos, así como en la muerte masiva de embriones y pollitos recién nacidos, lo que genera importantes pérdidas económicas (Kebede, 2010; Dinev *et al.*, 2013; Elsayed *et al.*, 2016; Mahmoud *et al.*, 2022). Además, su transmisión puede ser tanto vertical, a través del huevo, como

horizontal, mediante el agua, el alimento y la contaminación ambiental, lo que incrementa su diseminación en granjas avícolas (Lynch y Zhanel, 2022).

Un aspecto de gran relevancia es la notable resistencia intrínseca y adquirida de *P. aeruginosa* frente a antibióticos y desinfectantes, favorecida por mecanismos como bombas de eflujo, baja permeabilidad de la membrana externa y formación de biopelículas (Yousefi *et al.*, 2017; Lynch y Zhanel, 2022). Esta capacidad de persistencia ambiental, sumada a su arsenal de factores de virulencia regulados por quorum sensing, convierte a *P. aeruginosa* en una amenaza emergente en la producción avícola y en un agente zoonótico de interés en salud pública (Azam *et al.*, 2019).

2. Antecedentes

2.1 Importancia de la industria avícola: Los microorganismos como uno de los principales desafíos

La industria avícola constituye uno de los sectores más dinámicos y estratégicos dentro de la producción pecuaria mundial. Su relevancia radica, no solo en el volumen de proteína animal que aporta a la alimentación humana, sino también en su capacidad de generar empleos, divisas y desarrollo económico. A nivel global, el pollo de engorde y el huevo de mesa representan más del 35 % del total de carne y proteína animal consumida, consolidándose como alimentos accesibles, de alta calidad nutricional y con una cadena productiva altamente tecnificada (FAO, 2023).

En México, la avicultura es el motor de la producción pecuaria ya que aporta aproximadamente el 63 % del volumen pecuario nacional y el 37 % del Producto Interno Bruto (PIB) pecuario, convirtiéndose en el principal proveedor de proteína animal para la población (UNA, 2023). Para el 2024 el SIAP revelan que la producción de carne de pollo superó los 5 millones de toneladas anuales, mientras que la producción de huevo rebasó los 3.1 millones de toneladas, ubicando al país entre los mayores productores mundiales y el principal consumidor de huevo fresco

per cápita (**Tabla 1**). Estos indicadores reflejan la importancia estratégica de la avicultura para la seguridad alimentaria y la economía nacional (SIAP, 2025).

Tabla 1. Estadísticas económico de la producción pecuaria y avícola en México (SIAP, 2025)

| Producto/Especie | Producción (toneladas) | Precio (pesos por kilogramo) | Valor de la Producción (miles de pesos) | Animales sacrificados (cabezas) | Peso (kilogramos) |
|-------------------------------|------------------------|------------------------------|---|---------------------------------|-------------------|
| Ganado en pie | | | | | |
| Bovino | 4,002,013.021 | 39.48 | 157,988,580.205 | | 454.587 |
| Porcino | 2,236,283.171 | 34.62 | 77,417,042.147 | | 104.840 |
| Ovino | 132,328.709 | 42.84 | 5,668,821.186 | | 39.879 |
| Caprino | 80,658.892 | 35.52 | 2,864,690.586 | | 34.137 |
| Subtotal | 6,451,283.793 | | 243,939,134.124 | | |
| Ave y guajolote en pie | | | | | |
| Ave | 5,038,344.400 | 27.22 | 137,132,201.273 | | 2.379 |
| Guajolote | 25,201.744 | 43.52 | 1,096,849.276 | | 7.755 |
| Subtotal | 5,063,546.144 | | 138,229,050.549 | | |
| Total | | | 382,168,184.673 | | |
| Otros productos | | | | | |
| Huevo para plato | 3,171,783.599 | 27.73 | 87,969,090.976 | | |
| Miel | 58,033.177 | 43.47 | 2,522,534.377 | | |
| Cera | 1,360.139 | 76.80 | 104,462.747 | | |
| Lana | 3,797.227 | 5.83 | 22,127.282 | | |
| Subtotal | | | 90,618,215.382 | | |
| Total | | | 626,338,524.205 | | |

Además de su aporte productivo, la industria avícola tiene una fuerte implicación social, al garantizar alimentos accesibles para los sectores más amplios de la población, y generar una extensa red de empleos directos e indirectos en granjas, incubatorios, plantas de alimento balanceado, transporte y procesamiento. También representa un rubro esencial para el comercio, pues México mantiene un flujo constante de exportaciones e importaciones avícolas que sostienen su competitividad internacional.

No obstante, la magnitud de este sector también implica desafíos sanitarios relevantes. Los sistemas de producción intensiva favorecen la aparición y propagación de agentes infecciosos capaces de comprometer tanto la salud de las aves como la inocuidad alimentaria. Dentro de estos patógenos destacan

Salmonella Gallinarum y *Salmonella Pullorum*, responsables de la tifosis aviar y la pullorosis respectivamente, que históricamente han ocasionado brotes con alta mortalidad en pollitos, transmisión vertical a través de huevos fértiles y la necesidad de sacrificios sanitarios que representan pérdidas económicas considerables. Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa*, aunque considerada un microorganismo oportunista, ha sido aislada en incubatorios y pollitos recién nacidos, donde ocasiona infecciones del saco vitelino, septicemias y lesiones tisulares que reducen la viabilidad de los lotes.

La repercusión de estos microorganismos en la industria avícola mexicana es significativa: generan pérdidas directas por mortalidad y disminución de la producción, además de pérdidas indirectas derivadas de la implementación de medidas de bioseguridad, programas de monitoreo, tratamientos antimicrobianos y restricciones comerciales. Por ello, la investigación enfocada en la interacción huésped–patógeno de *S. Gallinarum/Pullorum* y *P. aeruginosa* resulta esencial para comprender los mecanismos de virulencia, desarrollar estrategias de prevención más eficaces y salvaguardar la competitividad de la industria avícola nacional.

2.2 Distribución de *Salmonella* y *Pseudomonas*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de distribución global, caracterizado por su versatilidad y capacidad de adaptación a diversos ambientes, tanto naturales como artificiales. Se encuentra comúnmente en suelos, aguas superficiales y ambientes hospitalarios donde coloniza superficies húmedas y dispositivos médicos, convirtiéndose en una de las principales causas de infecciones nosocomiales (Moradali *et al.*, 2017, Laborda *et al.*, 2021). Esta bacteria ha sido identificada en prácticamente todas las regiones del mundo (**Fig. 1**), especialmente en países con sistemas de salud sobrecargados, donde su resistencia a múltiples antibióticos agrava el control de brotes infecciosos (Li *et al.*, 2021). Además, su capacidad para formar biopelículas y su variabilidad genética contribuyen a su diseminación eficiente y a la colonización de distintos nichos y hospederos (Gellatly y Hancock, 2013).

Los aislamientos ambientales frecuentemente revelan cepas con resistencia y genes de resistencia emergentes, lo que sugiere que los ambientes naturales muchas veces actúan como reservorios para la diseminación global de clonas resistentes (Amsalu *et al.*, 2021). Por ejemplo, Amsalu y colaboradores en el 2021 detectaron el gen bla AIM-1 en aislamientos de aguas residuales, ríos y efluentes hospitalarios de Asia, Norteamérica y Europa, lo que confirma su amplia diseminación ambiental. En la misma línea, un análisis retrospectivo mundial de cepas productoras de carbapenemasa reveló la presencia de estas cepas en múltiples regiones, con mayor frecuencia en Asia y Oriente Medio y en zonas con menor regulación del uso de antimicrobianos (Wang *et al.*, 2021). Otro estudio genómico reciente, con 2,854 aislamientos de distintas regiones del mundo mostró que el 83 % de las cepas pertenecían al grupo filogenético 1 y que existen linajes comunes compartidos entre continentes, lo que demuestra la expansión intercontinental de clones exitosos (Harrington *et al.*, 2024).



Figura 1. Distribución mundial de *P. aeruginosa* creada a partir de los reportes de localización geográfica para cada genoma.

De igual forma la Salmonelosis aviar se encuentra presente en todo el mundo ya que al ser provocada por una bacteria específica de aves puede ser aislada de cualquier lugar donde exista avicultura en mayor o menor medida. En los últimos

años su prevalencia se ha limitado a regiones donde las condiciones socioeconómicas y culturales dificultan el desarrollo de planes eficientes para su erradicación (**Fig. 2**). La salmonelosis aviar es común en algunos países de Sudamérica, América Central, África y Asia. A pesar de que la presencia de *Salmonella Gallinarum* logró ser erradicada de las aves de corral en muchos otros países como EE. UU, Canadá, Nueva Zelanda, Australia, Japón, y la mayoría de los países de Europa todavía constituye un riesgo para la avicultura intensiva (Zhou *et al.*, 2022; Wales *et al.*, 2023). Es probable que la incidencia de ambas enfermedades esté subestimada, ya que la mayoría de los brotes se detectan en parvadas de traspatio y suelen no ser reportados, especialmente en países en desarrollo (Lozica *et al.*, 2024).

Sin embargo, la prevalencia de *S. Gallinarum* en estas áreas libres se puede ver comprometida por la presencia eventual de este patógeno en aves silvestres y de caza, de ahí la importancia del seguimiento epidemiológico de esta enfermedad. En los últimos años, ha resurgido la enfermedad en países que supuestamente habían erradicado el problema (Cailer, 2021).



Figura 2. Países donde se reportó la presencia de Tifosis Aviar en el período de 2016-2021.

2.3 Interacción huésped – hospedero. Factores de patogenicidad y respuesta del hospedero.

2.3.1 *Salmonella Gallinarum/Pullorum*

A diferencia de otros serovares que ocasionan cuadros entéricos autolimitados, *Salmonella Gallinarum/Pullorum* han desarrollado un tropismo sistémico en aves, consolidándose como modelos de estudio para comprender la interacción huésped–patógeno en infecciones bacterianas adaptadas a un hospedero específico (Barrow *et al.*, 2012; Wigley, 2017; Shaji *et al.*, 2023). Cabe señalar que las islas de patogenicidad constituyen grupos de genes responsables de codificar múltiples factores de virulencia. Actualmente se reconoce que *Salmonella* cuenta con al menos cinco de estas regiones genómicas principales: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 y SPI-5 (Tabla 1) (Adelantado *et al.*, 2008).

Tabla 2. Características de las Islas de Patogenicidad de *Salmonella*.

| Isla patogenicidad | Centisoma | Segmento DNA (kb) | Núm. Genes | Función |
|--------------------|-----------|-------------------|------------|---|
| SPI-1 | 63 | 35 -40 | 31 | Translocación de moléculas en el citoplasma |
| SPI-2 | 31 | 40 | 32 | Supervivencia intracelular |
| SPI-3 | 82 | 17 | | Supervivencia intracelular en macrófagos |
| SPI-4 | 92 | 27 | 18 | Secreción de toxinas. |
| SPI-5 | 20 | 7,5 | | Adaptación a macrófagos Reacción inflamatoria intestinal |

La patogenia comienza con la ingestión de un inóculo elevado de microorganismos, tras lo cual *Salmonella* atraviesa la barrera intestinal mediante células M, proceso facilitado por el sistema de secreción tipo III codificado en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1). Este evento induce la internalización bacteriana y desencadena una respuesta inflamatoria del hospedero, caracterizada por la liberación de citoquinas como IL-1 β e IL-8 que atraen heterófilos, equivalentes aviares de los neutrófilos. Sin embargo, en los serovares aviares la inflamación intestinal suele ser atenuada, lo que favorece la diseminación sistémica y refleja un ajuste evolutivo hacia la persistencia en el hospedero (Wigley, 2017; Burkovski *et al.*, 2024).

La bacteria utiliza macrófagos como vehículos para alcanzar hígado, bazo y médula ósea. El sistema de secreción tipo III-2 (SPI-2) resulta esencial, pues modula la maduración del fagosoma e impide la fusión lisosomal, permitiendo la supervivencia intracelular (Pico-Rodríguez *et al.*, 2023). A esto se suman mecanismos adicionales de evasión, como la supresión de óxido nítrico y la apoptosis de linfocitos T, que contribuyen al cuadro septicémico y a la alta mortalidad (Barrow y Freitas Neto, 2011). Investigaciones recientes han mostrado que, en serovares adaptados a animales de producción, SPI-1 puede sufrir procesos de degradación, lo cual refleja una pérdida selectiva de funciones de invasión intestinal en favor de la adaptación crónica al hospedero (Tambassi *et al.*, 2025). Esta plasticidad genética, sumada a la regulación mediada por pequeños ARN (sRNAs), constituye un nivel adicional de control de la virulencia y la persistencia bacteriana (He *et al.*, 2025).

Diversas especies hospedadoras pueden reaccionar de manera diferente a la infección por *Salmonella* (Marinus *et al.*, 2012). Mientras que los pollitos recién nacidos suelen sucumbir en pocos días frente a distintas formas de salmonelosis, los pollos adultos en ocasiones permanecen asintomáticos. Asimismo, las líneas genéticas de pollos influyen de manera determinante en la susceptibilidad, lo cual refleja diferencias hereditarias vinculadas al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y posiblemente a efectos pleiotrópicos o mecanismos aún desconocidos (Redmond *et al.*, 2011; Calenge *et al.*, 2010). En este sentido, estudios transcriptómicos y de microarreglos se han generalizado en la última década y han permitido explorar cómo la infección modula perfiles de expresión génica en células y tejidos, revelando vías moleculares implicadas en la respuesta inmune innata y adaptativa (Hu *et al.*, 1997; Coble *et al.*, 2011; Galan y Cossart, 2005; Te Pas *et al.*, 2008). Más recientemente, se ha enfatizado la necesidad de considerar el microbiota intestinal como un actor central en la tríada *Salmonella*–huésped–microbiota, pues el equilibrio microbiano modula la colonización y el curso de la enfermedad (Grzymajlo *et al.*, 2022).

En cuanto al cuadro clínico, *S. Pullorum* afecta principalmente a aves jóvenes y causa una sintomatología caracterizada por diarreas blanquecinas, abdomen

distendido, retraso en el crecimiento y un estado crónico de portador. La infección sistémica cursa con hepatoesplenomegalia y lesiones blanquecinas focales en hígado y bazo de ambos sexos (Tindall *et al.*, 2005; Barrow *et al.*, 2011). Una característica epidemiológicamente crítica es la transmisión vertical: el patógeno invade los huevos y coloniza los embriones, que nacen infectados en el saco vitelino. En su forma aguda, la pulorosis afecta casi exclusivamente a polluelos, y la bacteria puede aislarse de múltiples órganos, tejidos y excretas, lo que facilita la rápida diseminación en los planteles avícolas.

La activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ resulta fundamental para contener la infección, y la resistencia se asocia con una respuesta Th1 robusta, caracterizada por la producción de IFN- γ , que potencia la actividad microbicida de los macrófagos (Withanage *et al.*, 2005). Sin embargo, la persistencia de *S. Pullorum* en órganos linfoides indica una evasión parcial de la respuesta adaptativa, favoreciendo el establecimiento de portadores crónicos. Estudios recientes han confirmado que esta interacción dinámica no puede comprenderse sin integrar los componentes inmunes del hospedero con el repertorio genético de resistencia antimicrobiana de la bacteria; por ejemplo, se ha descrito que la transición de serovares aviares hacia un estado endémico se ve mediada por adaptaciones en su resistoma, lo que asegura la supervivencia bajo presión antibiótica y facilita la transmisión en ambientes de producción intensiva (Jia *et al.*, 2025).

En conjunto, la interacción huésped–patógeno en la salmonelosis aviar refleja un delicado balance entre la virulencia bacteriana y la respuesta inmune del hospedero. *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* se han especializado en minimizar la inflamación intestinal, evadir la inmunidad sistémica y aprovechar vulnerabilidades asociadas a la edad, la genética y el microbiota de las aves. Esto explica por qué los cuadros clínicos abarcan desde mortalidad temprana hasta estados de portador persistente, con importantes implicaciones epidemiológicas. La incorporación de estudios genómicos, transcriptómicos y de microbiota en la última década, sumados a los avances en la comprensión de la regulación de la virulencia por sRNAs, ha enriquecido notablemente el conocimiento sobre los genes que están involucrados

estos procesos (**Fig. 3**) y abre nuevas perspectivas para el diseño de vacunas y estrategias de control más eficaces (Tolooe *et al.*, 2025).

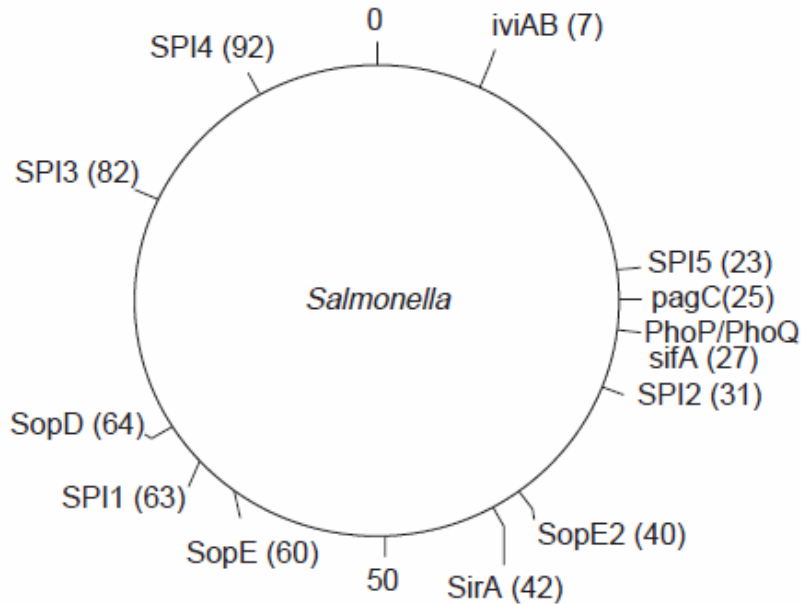


Figura 3. Localización de los genes de virulencia en el genoma de *Salmonella*.

2.3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Se ha reportado que *P. aeruginosa* puede causar infecciones en diferentes tejidos y órganos de una gran variedad de animales incluyendo las aves. Aunque esta bacteria no es un patógeno aviar clásico, se le ha implicado en enfermedades secundarias o brotes en condiciones de estrés o inmunocompromiso (Abd El-Ghany *et al.*, 2021). Específicamente en pollos jóvenes o embriones, *P. aeruginosa* puede dar lugar a infecciones del saco vitelino, septicemias y muerte. Para aves adultas algunos estudios han descrito que puede causar principalmente enfermedades respiratorias, septicemia, dermatitis y queratoconjuntivitis, gracias a la producción de diversas toxinas y enzimas que facilitan la invasión y el daño en los tejidos (Algammal *et al.*, 2023). La interacción entre el patógeno y el huésped depende de varios factores como la virulencia de la bacteria, la susceptibilidad del hospedero, la respuesta inmune y el ambiente. (Paz *et al.*, 2019).

La capacidad de *P. aeruginosa* para causar un amplio rango de infecciones radica en la gran variedad de factores de patogenicidad que posee. Estos pueden dividirse en dos grandes grupos: factores asociados a la célula bacteriana (como lipopolisacáridos, flagelos y pili) y factores secretados (como exotoxina A, proteasas, elastasas, hemolisinas, fosfolipasa C, ramnolípidos y piocianina), todos ellos involucrados en la colonización, invasión y daño tisular (Gupta *et al.*, 2011; Habeeb *et al.*, 2012; Aljebory, 2018; Paz *et al.*, 2019) (**Tabla 2**). Además, la bacteria cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten ajustar la expresión génica en función del ambiente. De hecho, es una de las bacterias con mayor proporción de genes dedicados a la regulación transcripcional (Stover *et al.*, 2000). El sistema regulador más importante es el quorum sensing (QS), que controla de manera global muchos de estos factores de virulencia y coordina su expresión en respuesta a la densidad bacteriana, favoreciendo tanto la infección aguda como la persistencia.

Tabla 3. Factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*.

| Factores | Genes o proteínas involucradas |
|--|-----------------------------------|
| Asociados a célula bacteriana | |
| Flagelo | FliC, FliD |
| Pili (Tipo IV) | PilA, PilB, PilT, PilU |
| Proteínas de membrana | LecA, LecB, LPS |
| Secretados | |
| Factores asociados a la formación de biopelícula | PelA-PelG, Psl, alginato |
| Efectores SST2 | LasA, LasB |
| Efectores SST3 | ExoA, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY |
| Efectores SST5 | EstA |
| Pigmentos | Piocianina |
| Efectores <i>quorum sensing</i> | LasIR, RhlIR, rhlAB, hcnABC, chic |

SST2, sistema de secreción tipo 2; SST3, sistema de secreción tipo 3; SST5, sistema de secreción tipo 5.

Respecto a la respuesta del hospedero, los estudios son más limitados. Se sabe que la infección con *P. aeruginosa* induce respuestas inflamatorias con secreción de citoquinas proinflamatorias como son la IL-6, IL-8, TNF- α , activación de vías como NF- κ B y reclutamiento de células inmunes al sitio de infección (Li *et al.*, 2020).

En un estudio que evaluó la coestimulación de partículas PM_{2.5} (presentes en los ambientes avícolas) y *P. aeruginosa*, se observó que juntas agravan la inflamación pulmonar y aumentan la expresión de IL-6, IL-8 y TNF- α mediante activación de NF- κ B (Li *et al.*, 2020). Esto sugiere que factores ambientales modulan la gravedad de la infección.

En modelos generales de interacción *P. aeruginosa*–huésped, se han descrito estrategias de evasión de la inmunidad innata: resistencia a fagocitosis, tolerancia a especies reactivas de oxígeno y modulación de la respuesta inflamatoria mediante supresión de señales inmunes. Además, las estructuras de biofilm impiden el acceso de células inmunes al sitio bacteriano y limitan la acción de antimicrobianos (Sahu & Ruhal, 2025). Un punto crítico es la resistencia antimicrobiana que presenta *P. aeruginosa* en aislamientos aviares, que muestran múltiples mecanismos de resistencia, como baja permeabilidad de membrana externa, bombas de eflujo y genes resistentes móviles (Algammal *et al.*, 2023). Esta resistencia complica el tratamiento y favorece que la bacteria persista y reaparezca en planteles.

2.4 Resistencia a antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa exhibe muchos mecanismos de resistencia a antibióticos, incluyendo enzimas que modifican a los antimicrobianos como β -lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, la adquisición plásmidos que codifican para genes de resistencia, permeabilidad limitada para los antimicrobianos y la posibilidad de generar una bomba dependiente de energía que expulsa al antimicrobiano fuera de la bacteria (Llanes *et al.*, 2011). La bacteria también tiene la capacidad para producir una serie de proteasas (proteasa alcalina, proteasa IV) y elastasas, enzimas capaces de degradar múltiples proteínas inmunoreguladoras, incluyendo las proteínas surfactantes A y D, inmunoglobulinas y péptidos antibacterianos (Bakheet y Torra, 2020).

Se han identificado en *P. aeruginosa* mutaciones en genes cromosomales que les confieren resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. Dichas mutaciones se encuentran en los genes involucrados en la síntesis de

péptidoglucano (ampD, dacB, y ampR). Así mismo, las mutaciones específicas en ampC incrementan la resistencia a cefalosporinas antipseudomonas. La resistencia a carbapenémicos, como imipenem y meropenem, se da mediante la impermeabilidad de la membrana externa gracias a una mutación en la codificación del gen OprD que disminuye la expresión de la proteína en este sitio. Se ha demostrado que las mutaciones en los genes de la ADN girasa (GyrA7, GyrB) y la topoisomerasa tipo IV (ParC/ParE), inducen la resistencia a fluoroquinolonas. También se ha encontrado que cepas que codifican para el gen rmtA, que metila la subunidad 16s ARNr presentan resistencia a aminoglucósidos (Juan *et al.*, 2017).

Diversos artículos describen los mecanismos de resistencia de aislados de *P. aeruginosa* en México desde 1986, encontrando los genes *IMP-15* y *IMP-18*, que codifican para la producción de dos metalo- β -lactamasas y de la producción simultánea de diferentes tipos de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido). De la misma forma se ha descrito aislados que también cuentan con los genes *IMP-15* y *VIM-2* que confieren a la bacteria resistencia antibacteriana. En una persona con fibrosis quística se encontró *P. aeruginosa* productoras de las β -lactamasas OXA 141 (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2013; Garza-Ramos *et al.*, 2008). La alarmante situación de resistencia a los medicamentos por parte de *P. aeruginosa* se corresponde con la alta tasa de letalidad y morbilidad. Es difícil solucionar este problema en la práctica médica debido a su alta flexibilidad fisiológica (An *et al.*, 2019; Peña *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2021) (**Tabla 3**).

Tabla 4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana por *Pseudomonas aeruginosa*

| Mecanismo de resistencia | Gen / Proteína implicada | Antimicrobianos afectados |
|---|--|--|
| Disminución de la permeabilidad de la membrana externa | OprD, OprF, OprB | Imipenem, meropenem, quinolonas, aminoglucósidos |
| Bombas de eflujo | MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN | β -lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos |
| Producción de β-lactamasas | AmpD, DacB, AmpR, AmpC | β -lactámicos, penicilinas antipseudomonas |
| Modificación del blanco del antimicrobiano | GyrA, GyrB, topoisomerasa IV (ParC/ParE), rmtA | Fluoroquinolonas, aminoglucósidos |
| Transferencia horizontal de genes | Metallo- β -lactamasas (clase B) | Penicilinas, cefalosporinas, imipenem |

| Mecanismo de resistencia | Gen / Proteína implicada | Antimicrobianos afectados |
|---------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Cambios en la membrana bacteriana | Modificación del lípido A | Penicilinas |
| Sobreexpresión de β -lactamasas | Sobreexpresión de AmpC | β -lactámicos |

Tomada de Zarza *et al.*, 2019

2.5 Ensayos diagnósticos (Pruebas inmunológicas)

La identificación del organismo y la diferenciación de los biovares *Pullorum* y *Gallinarum* se realizan con pruebas serológicas y bioquímicas estándares. Pueden utilizarse pruebas comerciales para la identificación, como el sistema Índice de Perfil Analítico (API, por sus siglas en inglés); sin embargo, los resultados deben interpretarse con precaución ya que el sistema API puede identificar de manera incorrecta a *Salmonella pullorum* como *Hafnia spp.* Las cepas pueden enviarse a un laboratorio de referencia para el serotipado y el lisotipado de *Salmonella Pullorum*. Durante investigaciones epidemiológicas, las cepas pueden identificarse mediante el análisis del perfil de plásmidos, electroforesis en gel de campo pulsado o la ribotipificación (Lorenzoni, 2021). Por otro lado, la prueba de ELISA puede ser utilizada para detectar todos los serovares del grupo D de *Salmonella*, utilizando una combinación de antígeno D-LPS y antígeno flagelar para eliminar las posibles reacciones positivas contra la infección con *S. enteritidis* (Barrow *et al.*, 2011).

La prueba rápida de aglutinación de sangre entera se puede utilizar en condiciones de campo para detectar tanto *S. Pullorum* como *S. Gallinarum*. Las aves que reaccionan a la prueba se pueden identificar de forma inmediata. El mismo antígeno se utiliza para detectar *S. Pullorum* y *S. Gallinarum*, pero la detección de esta última puede ser relativamente pobre. Los pollos se pueden analizar a cualquier edad, aunque algunas autoridades especifican un mínimo de edad de 4 meses. Los resultados positivos de los polluelos menores de 4 semanas de edad pueden deberse a los anticuerpos de origen materno (Lorenzoni, 2021).

Se han establecido numerosos ensayos para la determinación de *P. aeruginosa*. Estos ensayos incluyen el cultivo microbiológico (Deschaght *et al.*, 2009), reacción en cadena de la polimerasa (Aghamollaei *et al.*, 2015), relajación magnética

bintERRUPTOR aptasensor (Tao *et al.*, 2018), ensayo de flujo lateral (Chen *et al.*, 2016), microfluidos plataforma (Mungroo *et al.*, 2016), prototipo de sensor microbiano de células enteras Shah y Naseby ,2015) y biosensor electroquímico (Liu *et al.*, 2016)

2.5.1 Técnica de PCR para la identificación

Los marcadores moleculares se han consolidado como herramientas fundamentales en la microbiología moderna, ya que permiten identificar con precisión especies, serotipos y variantes bacterianas, así como monitorear genes relacionados con virulencia, resistencia antimicrobiana y adaptación ecológica. Su uso ha transformado los sistemas de diagnóstico, vigilancia epidemiológica y control de enfermedades infecciosas tanto en salud humana como animal, incluyendo la industria avícola, donde patógenos como *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum* representan desafíos sanitarios y económicos significativos.

En el caso de *Pseudomona aeruginosa*, una especie oportunista con un amplio rango de hospedadores y una notable plasticidad genética, los primeros esfuerzos sistemáticos de caracterización molecular se remontan a la secuenciación del genoma de la cepa PAO1, donde se identificaron más de 5500 genes codificantes, incluyendo múltiples determinantes de resistencia y virulencia (Stover *et al.*, 2000). A partir de esta referencia, diversos estudios han utilizado genes altamente conservados, como oprL, oprI, gyrB y 16S rRNA, como marcadores moleculares para la identificación rápida y específica de la especie en muestras clínicas y ambientales (De Vos *et al.*, 1997; Spilker *et al.*, 2004). Específicamente el gen (oprL) de lipoproteína asociada a peptidoglicano producido sustancialmente participa en la integridad de *P. aeruginosa* y en los sistemas de transporte de eflujo que afectan la permeabilidad celular, por lo que es un factor importante para la resistencia a los antimicrobianos en *P. aeruginosa* (De Vos *et al.*, 1997 y Abdullahi *et al.*, 2013).

Más recientemente, la disponibilidad de miles de genomas completos ha permitido la identificación de marcadores más robustos mediante enfoques pangenómicos e *in-silico*. Estudios como los de Mosquera-Rendón *et al.*, 2016 y Zhao *et al.*, 2023

han demostrado que el pangenoma de *P. aeruginosa* es altamente abierto, con una proporción de genes “cloud” superior al 80 %, lo que refleja una gran diversidad genética y la necesidad de seleccionar marcadores en regiones altamente conservadas. Además, genes asociados a sistemas de resistencia como blaVIM, blaIMP, blaAIM-1, mexAB-oprM, mexXY y OXA-50 han sido ampliamente empleados como marcadores moleculares en programas de vigilancia, especialmente en contextos hospitalarios y ambientales (Amsalu *et al.*, 2021; Alcock *et al.*, 2020). La detección de estos genes permite no solo confirmar la identidad de la especie, sino también caracterizar perfiles de resistencia relevantes para la salud pública y la industria avícola.

El análisis de serotipo tradicional de *Salmonella* se realiza principalmente basado en el esquema White-Kauffmann-Le Minor, que identifica los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), utilizando la prueba de aglutinación en portaobjetos (Grimont y Well, 2007). Sin embargo, las pruebas del antígeno H de *S. enteritidis* es un proceso agotador y que requiere mucho tiempo y de la inducción del crecimiento del flagelo, añadiendo gran carga de trabajo para los investigadores, especialmente cuando es necesario determinar el rango de muestras. Por conveniencia, el método de PCR específico y sensible ha sido ampliamente desarrollado y aplicado para detectar diferentes patógenos (Hoorfar, 2011; Majchrzak *et al.*, 2014). Por ejemplo, un ensayo de PCR de dos pasos que utiliza genes que codifican los antígenos O, H y Vi (*rfb*, *fliC*, *fliB* y *viaB*) ha sido utilizado para identificar algunos de los serotipos de *Salmonella* (Muñoz *et al.*, 2010). Según Xu *et al.*, 2018 el gen único SPUL-2693 o *ipaJ* han sido utilizados como objetivos para identificar *S. Pullorum/Gallinarum* o *S. Pullorum*, respectivamente. La detección por PCR de *Salmonella* y sus serotipos presenta una gran demanda y cada vez son explorados más genes que son específicos en todas las *Salmonellas*.

El gen *cigR* se localiza en la isla de patogenicidad 3 de *Salmonella*. (Niemann *et al.*, 2011), que codifica CigR que actúa como efector T3SS2 y como proteína de membrana (Kingsley *et al.*, 2013). Según Zhou *et al.*, 2020 a través del alineamiento de secuencias, se encontró que, aunque *cigR* es generalmente conservado en

Salmonella, hay una ligera diferencia de secuencia entre *S. Pullorum/Gallinarum* y otros serotipos de *Salmonella*. Por lo que plantean que el gen *cigR* podría servir como posible marcador de clasificación para *S. Pullorum/Gallinarum*.

Dada la similitud genotípica que existe entre *Salmonellas* del grupo D (*S. Gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*) es importante recurrir a herramientas moleculares que permitan diferenciar cepas del mismo grupo. Existen regiones de polimorfismo en nucleótidos del gen *rfbS* de *S. Gallinarum* y de *S. Pullorum*. Este gen (*rfbS*) se ha encontrado únicamente presente en *Salmonellas* grupo D. El primero fue encontrado en la posición 598 para *S. Gallinarum* y el otro en la posición 237 para *S. Pullorum*. Para el caso de *S. Gallinarum* el polimorfismo se da en el cambio de una adenina en lugar de guanina en la posición 598. Con esta herramienta se puede identificar y diferenciar la relación genética existente entre cepas de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* (Park M-K *et al.*, 2001).

3. Justificación

Las empresas de producción avícola en la actualidad se enfrentan a múltiples problemas sanitarios a causa de distintos factores de manejo y medio ambiente. Con el paso del tiempo, estos problemas impactan negativamente en las parvadas ocasionando pérdidas económicas de gran magnitud. La calidad de la canal y el aumento de la capacidad reproductiva de las aves de corral es uno de los principales retos en esta década a los cuales se enfrentan los productores que deben superar día tras día, no obstante, los procesos de hacinamiento impiden un buen crecimiento de las aves y propician la proliferación de enfermedades bacterianas como el caso de *Pseudomonas aeruginosa*. Este patógeno afecta la calidad cárnica y a su vez la calidad de vida de la parvada. Por otro lado, la *Salmonella* es una bacteria que puede causar enfermedades en las aves y en los seres humanos que consumen alimentos contaminados. La detección temprana y precisa de la presencia de la bacteria en los alimentos y en el medio ambiente es crucial para prevenir la propagación de la enfermedad. La biología molecular puede ser una herramienta valiosa para la detección y cuantificación de la bacteria en muestras biológicas, lo que puede ayudar a mejorar la seguridad alimentaria y la salud pública.

4. Hipótesis.

A partir de la comparación de los genomas de género *Salmonella* y de los genomas de *Pseudomonas* podemos identificar marcadores moleculares para la detección de bacterias patógenas en aves de corral.

5. Objetivo general

Identificar marcadores moleculares para detectar *Salmonella* y *Pseudomonas* patógenas en aves de corral.

5.1. Objetivos específicos:

- Realizar genómica comparativa con los genomas del género *Salmonella* y *Pseudomonas*
- Establecer relaciones filogenómicas *Salmonella* y *Pseudomonas*
- Identificar secuencias específicas para proponer marcadores moleculares que permitan detectar a *Salmonella* y *Pseudomonas* patógenas de aves de corral.

6. Materiales y Métodos

6.1. Creación de la base de datos

Los genomas bacterianos pertenecientes al género *Salmonella* y *Pseudomonas* se descargaron en formato (.fna) de la base de datos del “Genome information by organism” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Se seleccionó el NCBI porque es una base de datos muy completa y su información está disponible de manera gratuita accediendo simplemente a través de un buscador. Una vez descargados los genomas se elaboraron tablas de clasificación para los genomas de los géneros *Pseudomonas* y *Salmonella* (*Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*) en base al nivel de ensamblaje en el que se encontraban los datos (Completo, Cromosoma, Scaffold, Contig).

De igual manera se descargó del NCBI un archivo por cada secuencia en formato .txt llamado Assembly statistics report los cuales contenían información acerca del ensamblaje, nombre del organismo, el tipo de muestra, longitud total del genoma, el número de acceso GenBank, el código Biosample, nombre del aislado, el número de replicones (cromosomas y plásmidos) y el N50 Y L50 en caso de ser Scaffolds y Contigs. Todo esto se obtuvo con la ayuda de un script y comandos básicos en la terminal de Linux.

Para validar los genomas, se utilizó el programa de CheckM, una herramienta que evalúa la calidad de los genomas derivados de cualquier origen de manera automatizada. El CheckM, nos brinda datos en valores porcentuales de integridad, contaminación y heterogeneidad de los genomas analizados. La correcta interpretación de estos parámetros es crucial para la curación de bases de datos genómicas. Diversos autores han sido enfáticos que al incluir genomas con baja completitud o alta contaminación puede alterar significativamente la inferencia de relaciones filogenéticas, el cálculo de pangenomas y la identificación de genes específicos (Bowers *et al.*, 2017; Almeida *et al.*, 2019; Pasolli *et al.*, 2019). Por esta razón, se aplicaron criterios estrictos de filtrado: se eliminaron los genomas con más de un 20 % de contaminación y con menos de un 80 % de integridad, siguiendo los parámetros preestablecidos por el CheckM y recomendaciones establecidas por

iniciativas internacionales como la Genomic Standards Consortium (GSC) y el marco de Minimum Information about a Metagenome-Assembled Genome (MIMAG) (Bowers *et al.*, 2017). Para determinar el contenido de G+C de los genomas se utilizó el programa Quast, utilizando los genomas (.fna) como archivos de entrada. Y se obtuvieron otras características como hospederos, tipos de muestra, localización geográfica y fecha de colección con la ayuda de un script y comandos básicos en la terminal de Linux utilizando como archivos de entrada el código biosample de la secuencia. De esta forma se creó una base de datos ya con genomas completamente validados en un servidor del Centro de Investigación de Dinámica Celular en el laboratorio de Bioinformática y Genómica Comparativa, en donde se clasificaron por medio de directorios a nivel de género, especie y tipo de ensamblaje.

6.2 Análisis taxonómicos

Se realizaron dos análisis taxonómicos:

Cladograma: Mediante el estudio de las secuencias concatenadas del genoma central (también conocido como genoma núcleo o básico) utilizando los programas Prokka y Roary. Prokka es una herramienta valiosa para el análisis genómico bacteriano, desarrollada en Perl, que emplea diversas herramientas de predicción para identificar las coordenadas de las características genómicas dentro de los contigs. Entre estas herramientas se encuentran Prodigal, que predice las secuencias codificantes (CDS); RNAmmer, que identifica los genes de RNA ribosomal (rRNA); Aragorn, que identifica los genes de RNA de transferencia; SignalP, que predice los péptidos señal; e Infernal, que predice los RNA no codificantes (Torsten Seemann, 2014). Los archivos generados por Prokka se utilizaron como entrada en el programa Roary, que también está implementado en Perl y se utiliza para el análisis de procariotas. Roary construye pangenomas a gran escala identificando los genes centrales, es decir, los genes compartidos entre los genomas de interés de miles de muestras de procariotas (Andrew J *et al.*, 2015). El archivo newick resultado de roary será utilizado para la creación del cladograma.

Análisis filo genómico: Se realizó utilizando GET_HOMOLOGUES y GET_PHYLOMARKERS. La primera permite identificar genes homólogos entre múltiples genomas bacterianos mediante algoritmos como BLAST, OrthoMCL y COGtriangles. Utiliza los archivos gbk de salida de Prokka y su propósito principal es detectar grupos de genes ortólogos y parálogos que pueden ser usados para analizar el pan-genoma de un conjunto de cepas, es decir, el conjunto total de genes compartidos (genoma central) y no compartidos (genoma accesorio y único) entre ellas.

Por su parte, GET_PHYLOMARKERS complementa a GET_HOMOLOGUES al seleccionar, entre los ortólogos identificados, aquellos que son más adecuados como marcadores filogenéticos. Para ello, aplica filtros basados en criterios como la ausencia de saturación filogenética, la composición equilibrada de nucleótidos y la congruencia filogenética. El objetivo es generar una matriz concatenada de genes confiables del core genome que permita construir árboles filogenéticos robustos y representativos. Esta herramienta es esencial para delimitar especies, analizar relaciones evolutivas profundas y evaluar la coherencia entre genomas relacionados. Ambas herramientas han sido desarrolladas para facilitar estudios a gran escala sobre evolución microbiana, sistemática y clasificación genómica con alta precisión y reproducibilidad (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013; Vinuesa y Contreras-Moreira, 2015).

6.3 Genómica comparativa.

Se realizó genómica comparativa para identificar las secuencias conservadas asistido una vez más en los programas Prokka y Roary. El programa Prokka es una herramienta útil en el análisis genómico bacteriano, basada en el lenguaje de programación Perl. Prokka es conocida por su velocidad y eficiencia en la anotación de genomas. Puede procesar genomas completos en cuestión de minutos logrando una predicción precisa de genes a través de algoritmos avanzados para predecir no solo genes sino también ARNt, ARNr y otras características. Algunas de las herramientas de este programa son el Prodigal, los Aragorn y SignalP las cuales generan archivos de salidas estandarizados en formato Fasta, Gff y Genbank

(Torsten Seemann, 2014). Estos archivos de salida de Prokka se utilizarán como archivos de entrada en el programa Roary, este también constituye una herramienta valiosa para el análisis de genoma procariota que se utiliza para construir pangenomas a partir de ensamblajes anotados en formatos GFF 3 (archivo de salida del Prokka). En el pangenoma esta representado todos los genes presentes en una población bacteriana, y se compone de un genoma central o core genome, formado por genes conservados que cumplen funciones esenciales y están presentes en todas las cepas, y un genoma accesorio, integrado por genes variables se dividen en tres grupos (Soft core 95–99 % de los genomas, Shell genome 15–95 % de los genomas y Cloud genome presentes en menos del 15 % de los genomas). Este genoma accesorio puede aportar ventajas selectivas, como resistencia antimicrobiana, adaptación ambiental o especificidad de hospedero (Medini *et al.*, 2005; Vernikos *et al.*, 2015; Andrew J *et al.*; 2015).

Se utilizó también el programa ANI (Average Nucleotide Identity) para comparar genomas completos o parciales de microorganismos y determinar su grado de similitud genética. ANI calcula el porcentaje promedio de identidad nucleotídica entre fragmentos ortólogos compartidos por dos genomas, y ha sido ampliamente adoptado para la delimitación de especies bacterianas, reemplazando gradualmente la hibridación ADN-ADN (DDH), que era menos precisa y más laboriosa. Se considera que un valor de ANI igual o superior al 95-96% indica que dos cepas pertenecen a la misma especie (Richter y Rosselló-Móra, 2009). Herramientas como FastANI o OrthoANI han facilitado el análisis masivo de datos genómicos y han mejorado la clasificación taxonómica microbiana (Jain *et al.*, 2018). Además, ANI se ha convertido en un criterio estándar para proponer nuevas especies bacterianas, ya que permite comparar genomas con alta sensibilidad y especificidad (Kim *et al.*, 2014).

6.4. Identificación de los marcadores moleculares

La identificación de posibles marcadores moleculares se llevó a cabo a partir del análisis de matrices pangenómicas generadas previamente para cada uno de los grupos bacterianos en estudio. Este enfoque permitió detectar regiones génicas

conservadas o diferenciales con potencial utilidad para el desarrollo de herramientas moleculares de diagnóstico y vigilancia.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, la identificación se realizó a nivel de especie mediante un enfoque por exclusión progresiva. Primero, se seleccionaron genes pertenecientes al genoma central (core genome) que estén presentes en la totalidad o en la gran mayoría de las cepas analizadas, garantizando así su conservación intraespecífica. Posteriormente, cada una de estas secuencias candidatas fue contrastada contra la base de datos del NCBI mediante búsquedas BLAST, con el objetivo de verificar su ausencia en otros géneros o especies. De esta manera, se confirmó la especificidad taxonómica de los marcadores seleccionados, evitando secuencias compartidas con otras especies del género *Pseudomonas* o con microorganismos filogenéticamente relacionados.

Por otro lado, para *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*, se aplicó una estrategia comparativa dirigida a identificar diferencias genómicas específicas entre ambos serotipos, aprovechando las matrices pangenómicas que se generaron para este conjunto. Se buscaron genes o regiones exclusivas de un serotipo y ausentes en el otro, que sirvieran como marcadores diferenciales para su identificación molecular. Las secuencias candidatas seleccionadas fueron igualmente contrastadas contra la base de datos del NCBI para confirmar su especificidad y descartar regiones conservadas en otras variantes de *Salmonella* o especies no relacionadas.

7. Resultados

7.1. Creación de una base de datos para *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*

Los genomas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Salmonella* fueron descargados el 1 de abril de 2024 desde la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), considerada la plataforma de referencia más importante a nivel internacional para la consulta y el acceso a secuencias genómicas (**Tabla 4**). Posteriormente, el 13 de mayo del 2024, se realizó una actualización del conjunto de datos, incorporando 42 nuevos

ensamblajes tipo scaffold recientemente reportados para *Salmonella Pullorum* (**Tabla 5**).

Dado que el NCBI es una base de datos altamente dinámica, en la cual la cantidad de genomas disponibles y su nivel de ensamblaje pueden variar con el tiempo debido a la incorporación, corrección o eliminación de registros, se implementó un monitoreo continuo durante el desarrollo de la investigación. Este seguimiento permitió verificar que no ocurrieron cambios significativos en el número total de genomas reportados para los géneros objeto de estudio, por lo que se decidió trabajar con el conjunto de genomas correspondiente a la actualización de mayo del 2024 (**Tabla 5**), garantizando así la consistencia de los análisis posteriores.

Tabla 5. Cantidad de genomas totales reportados para ambos géneros en el NCBI hasta el 1 de abril del 2024.

| Base de Datos NCBI | Completos | Cromosomas | Scaffolds | Contigs | Genoma total |
|------------------------------|-----------|------------|-----------|---------|--------------|
| <i>Pseudomonas</i> | 2,114 | 290 | 6,676 | 30,5956 | 39,672 |
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 1,004 | 132 | 4,345 | 25,087 | 30,662 |
| <i>Samonella</i> | 2,345 | 279 | 6,748 | 521,816 | 531,188 |
| <i>Salmonella Gallinarum</i> | 7 | 12 | 2 | 67 | 88 |
| <i>Salmonella Pullorum</i> | 6 | 0 | 2 | 110 | 118 |

Los genomas se muestran separados de acuerdo con el nivel de ensamblaje (Completo, Cromosomas, Scaffolds, Contigs)

Tabla 6. Cantidad de genomas totales reportados para ambos géneros en el NCBI hasta el 13 de mayo del 2024.

| Base de Datos NCBI | Completo | Cromosomas | Scaffolds | Contigs | Genoma total |
|-------------------------------|----------|------------|-----------|---------|--------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1008 | 137 | 4,413 | 27 340 | 32,898 |

| | | | | | |
|------------------------------|---|----|----|-----|-----|
| <i>Salmonella Gallinarum</i> | 7 | 12 | 2 | 67 | 88 |
| <i>Salmonella Pullorum</i> | 6 | 1 | 45 | 110 | 162 |

Los genomas se muestran separados de acuerdo con el nivel de ensamblaje (Completo, Cromosomas, Scaffolds, Contigs)

En el caso de *Salmonella* se decidió solo realizar genómica comparativa entre los serotipos *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en busca de secuencias que puedan ser utilizadas como marcadores moleculares, para diferenciar estos serotipos. Esto teniendo en cuenta que bioinformáticamente es muy complicada realizar genómica comparativa con todo el género ya que están reportados alrededor 592,600 genomas (**Tabla 4**).

En el caso de *P. aeruginosa* inicialmente se descargó y caracterizó secuencias incorrectas, en el sentido de que en la búsqueda de los genomas en el NCBI se cometió un error de nomenclatura de dicha especie. Una vez que se detectó el error se empezó el análisis nuevamente con las secuencias correctas. Para la identificación de marcadores moleculares de *P. aeruginosa* se ocuparon las secuencias mejores ensambladas (completos y cromosomas) además de 2 scaffolds y 56 contigs. Estos últimos 58 genomas a pesar a que presentan los niveles de ensamblajes más bajos se utilizaron porque son los que han sido reportados para pollos hasta la fecha. Esta selección se realizó porque al igual que *Salmonella* el género posee muchos genomas y es extremadamente tardado y complicado trabajar con tantos desde el punto de vista bioinformático.

Una vez descargados los genomas seleccionados, se procedió a su caracterización bioinformática, conformándose así una base de datos personalizada alineada con los objetivos específicos de esta investigación (**Tabla 6**). Entre los criterios utilizados para la elaboración de dicha base, se incluyó el contenido de guanina y citosina (GC), considerado un parámetro genómico fundamental.

Los valores de contenido GC se obtuvieron mediante el programa QCAST, el cual generó archivos de salida en formato *.txt* que contenían el porcentaje de GC correspondiente a cada genoma analizado (**Fig. 4**). Esta información se empleó

como criterio de validación genética, con el fin de garantizar la coherencia y la calidad del conjunto de datos. En este sentido, serían descartados aquellos genomas cuyo contenido GC se alejarán significativamente del valor esperado para la especie o serotipo en cuestión, ya que tales diferencias pueden indicar errores de ensamblaje, contaminación o asignaciones taxonómicas incorrectas.

Tabla 7. Representación de solo 10 genomas de las tablas de características

| GenBank | Biosample | Organism name | Intraspecific name | Isolate | GC (%) | Total-length (bp) |
|-----------------|--------------|--|--------------------|---------|--------|-------------------|
| GCA_003441515.1 | SAMN09859345 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | WPB100 | | 66.1 | 6869565 |
| GCA_003441535.1 | SAMN09859346 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | WPB101 | | 66.1 | 6871984 |
| GCA_003441555.1 | SAMN09859344 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | WPB099 | | 66.1 | 6872115 |
| GCA_003441575.1 | SAMN09859343 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | WPB098 | | 66.31 | 6515212 |
| GCA_003665495.1 | SAMN09389275 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | 6762 | | 66.13 | 6714842 |
| GCA_003795165.1 | SAMN09270621 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | BH9 | | 65.81 | 7197041 |
| GCA_003952745.1 | SAMN10093512 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | PGN5 | | 66.59 | 6264451 |
| GCA_003952765.1 | SAMN10093511 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | PGN4 | | 66.54 | 6264422 |
| GCA_004000495.1 | SAMN10449147 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | GIMC5016:PA1840 | | 65.96 | 6750271 |
| GCA_004346985.1 | SAMN08706629 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | PA-VAP-3 | | 66.23 | 6665262 |
| GCA_004347005.1 | SAMN08706627 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (g-proteobacteria) | PA-VAP-1 | | 66.52 | 6382137 |

| Molecule-count | Integridad (%) | Contaminación (%) | Heterogeneidad (%) | Host | Isolation source | Sample type | Geographic Location | Collection date |
|----------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------|----------------------|-------------------|------------------------|-----------------|
| 1 | 99.63 | 0.53 | 0 | | hospital wastewaters | Cell culture | Singapore | 2014-09 |
| 1 | 99.68 | 0.53 | 0 | | hospital wastewaters | Cell culture | Singapore | 2014-09 |
| 1 | 99.63 | 0.53 | 0 | | hospital wastewaters | Cell culture | Singapore | 2014-09 |
| 1 | 99.63 | 0.08 | 0 | | hospital wastewaters | Cell culture | Singapore | 2014-09 |
| 1 | 99.68 | 0.11 | 0 | | hospital | organism | China: Lanzhou | 2015 |
| 2 | 99.39 | 1.03 | 12.5 | Homo sapiens | | urine | Brazil: Belo Horizonte | 2011 |
| 1 | 99.68 | 0.08 | 0 | | missing | Microbial isolate | USA: WV, Huntington | 2017-11-21 |
| 1 | 99.04 | 0.08 | 0 | | missing | Microbial isolate | USA: WV, Huntington | 2014-09-13 |
| 1 | 99.68 | 0.53 | 20 | Homo sapiens | burn wound | | Russia: Moscow | 2015 |
| 1 | 99.68 | 0.08 | 0 | Homo sapiens | BAL | | France | 2015-06-06 |
| 1 | 99.68 | 0.08 | 0 | Homo sapiens | BAL | | France | 2015-07-18 |

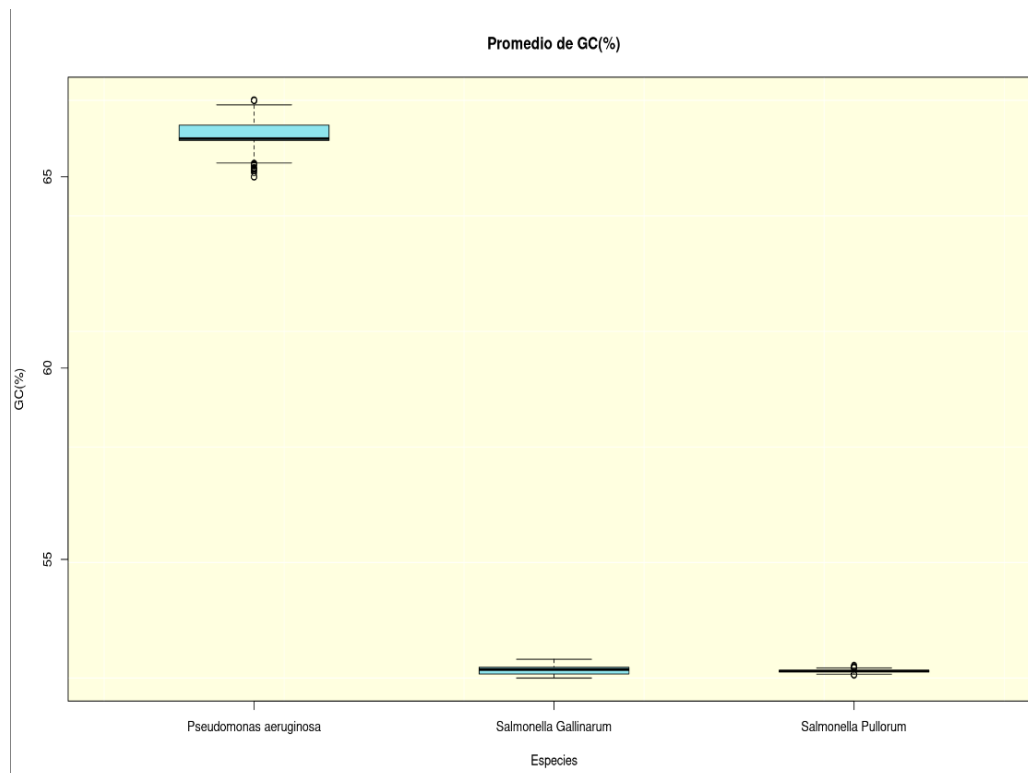


Figura 4. Promedio de GC % para *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*

Otro de los programas empleados para la validación de los genomas fue CheckM, una herramienta bioinformática desarrollada específicamente para evaluar la *completitud*, *contaminación* y *heterogeneidad* de ensamblajes genómicos a partir de conjuntos de genes marcadores conservados (Parks *et al.*, 2015). Su utilización resulta fundamental en estudios genómicos comparativos, ya que permite distinguir entre genomas de alta y baja calidad, evitando sesgos en análisis filogenómicos, pangenómicos y de elementos genéticos móviles (Bowers *et al.*, 2017; Parks *et al.*, 2017).

Tras la ejecución del programa, se generó un nuevo directorio de salida denominado checkM_output, junto con un archivo de texto plano nohup.out, el cual almacena información detallada sobre cada ensamblaje genómico analizado (**Fig. 5**). Este archivo presenta distintos parámetros que permiten evaluar de manera integral la calidad de los genomas.

| Bin Id | Marker lineage | # genomes | # markers | # marker sets | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5+ | Completeness | Contamination | Strain heterogeneity |
|-----------------|----------------|-----------|-----------|---------------|----|-----|---|---|---|----|--------------|---------------|----------------------|
| GCA_000009525.1 | Salmonella | 2 | 688 | 127 | 10 | 673 | 4 | 1 | 0 | 0 | 99.61 | 0.49 | 0 |

Figura 5. Visualización en la terminal Linux de los archivos de salida del programa CheckM en texto plano simple (nohup).

En primer lugar, el *Bin Id* corresponde al número de acceso en GenBank, lo que facilita la trazabilidad y vinculación de cada genoma con su depósito en la plataforma de la cual fueron extraídos. El campo *Marker lineage* identifica el linaje taxonómico estimado por CheckM a partir de genes marcadores universales, usualmente a nivel de género o familia, e indica además el número total de genomas o identidades genómicas empleadas en la evaluación de cada conjunto. El parámetro *Marker set* se refiere al conjunto completo de genes marcadores conservados utilizados como referencia para estimar la completitud y contaminación del genoma, asegurando una evaluación independiente de anotaciones externas.

Entre los indicadores más críticos destacan los tres últimos campos:

- **Integridad (Completeness)** cuantifica el porcentaje de genes marcadores esperados que se encuentran presentes en el ensamblaje, proporcionando así una estimación robusta del grado de completitud genómica. Valores altos indican que la mayoría de los genes esenciales están presentes.
- **Contaminación (Contamination)** revela la proporción de genes marcadores duplicados, lo que indica la presencia de secuencias de otros organismos o cepas, fenómeno frecuente en ensamblajes metagenómicos mal separados o contaminados en laboratorio.
- **Heterogeneidad (Strain heterogeneity)** mide la variabilidad genética dentro de un mismo conjunto de secuencias. Valores elevados (por ejemplo, cercanos al 100 %) sugieren la coexistencia de *subpoblaciones genéticamente distintas* dentro del mismo aislamiento, lo que puede deberse a coinfecciones, ensamblajes mezclados o variación intraclonal (Parks *et al.*, 2015; Bowers *et al.*, 2017).

Este proceso de filtrado riguroso permitió depurar la base de datos y conservar únicamente genomas de alta calidad, garantizando así la solidez de los análisis posteriores. En total, se eliminaron siete genomas de *P. aeruginosa*: cuatro debido a baja integridad y tres por presentar niveles elevados de contaminación, de acuerdo con los criterios previamente establecidos.

Por su parte, ningún genoma de *Salmonella Gallinarum/Pullorum* fue descartado bajo estos parámetros, lo que evidencia una adecuada calidad de los ensamblajes incluidos para este grupo.

Adicionalmente, se excluyeron tres genomas etiquetados como *P. aeruginosa* cuyos nombres no coincidían con la denominación tipo de la especie, pese a estar reportados como tales en bases de datos públicas. Esta depuración taxonómica y de calidad permitió asegurar que los análisis siguientes incluyendo las inferencias filogenéticas y filogenómicas, los estudios pangenómicos y la identificación de marcadores moleculares se realizaran sobre información precisa, confiable y estandarizada.

7.2. Anotación del genoma

Se realizó la anotación genómica para todos los genomas reportados de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* utilizando la herramienta Prokka.

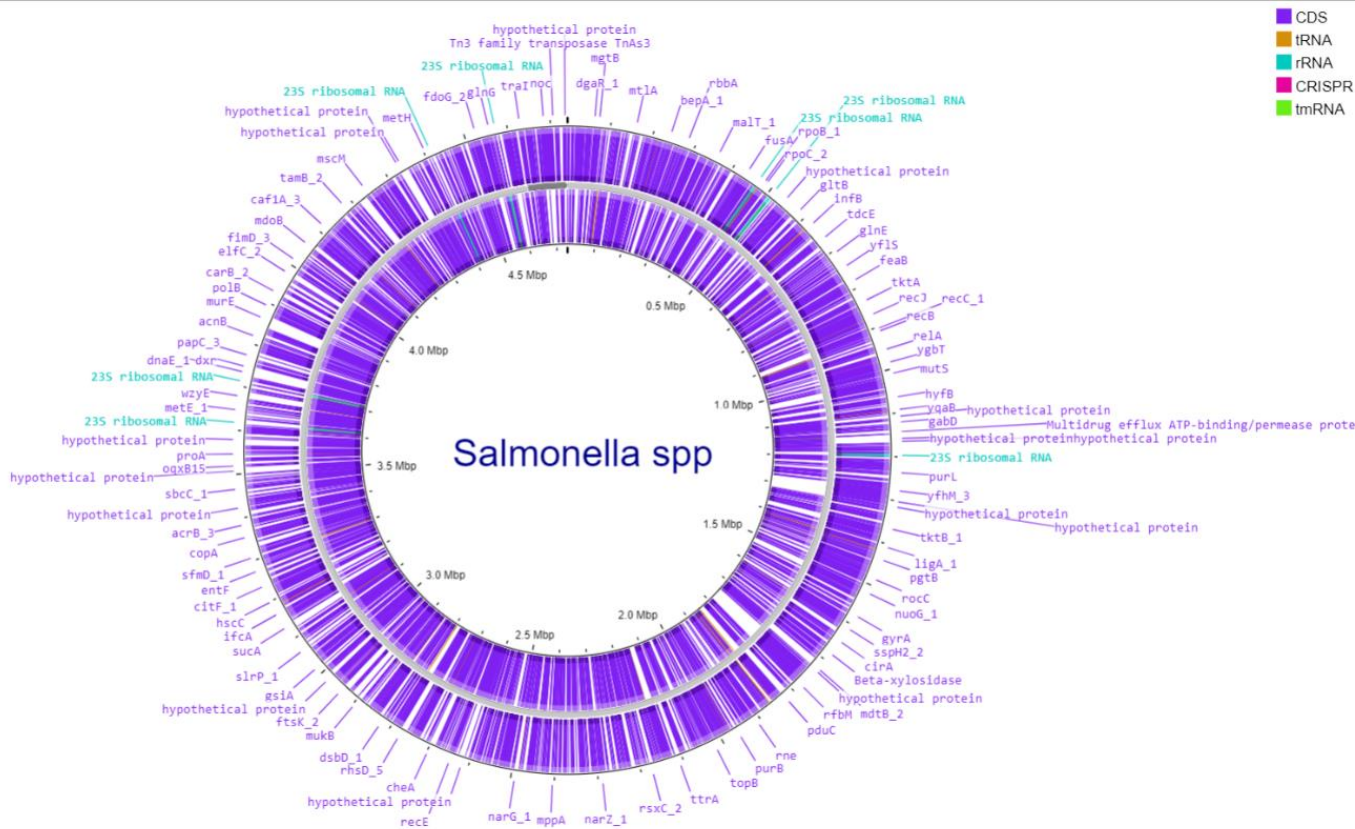


Figura 6. Mapa circular del genoma de *Salmonella spp.* generado mediante herramientas de anotación genómica. Se muestran las regiones codificantes (CDS) en color morado, tRNA en amarillo, rRNA en azul, regiones CRISPR en rojo y tmRNA en verde. La disposición circular permite visualizar la densidad y distribución de los genes a lo largo del genoma (~5 Mbp), destacando tanto genes conocidos como proteínas hipotéticas.

En la **Figura 7** se presenta una comparación cuantitativa de distintas características genómicas anotadas para ambos serotipos. *Salmonella pullorum* presentó un número ligeramente menor de contigs (44) en comparación con *Salmonella gallinarum* (47), lo que sugiere una leve mejora en la calidad del ensamblaje.

En cuanto a las secuencias codificantes (CDS), *Salmonella pullorum* mostró un total de 4749, superando a *Salmonella gallinarum* con 4630 CDS. Esta misma tendencia se observó en el número total de genes, con 4820 en *Salmonella Pullorum* y 4707 en *S Salmonella Gallinarum*. Se identificaron 8 genes rRNA en *Salmonella Gallinarum* frente a 4 en *Salmonella Pullorum*, mientras que ambas especies

compartieron el mismo número de regiones repetidas (2) y de tmRNA (1). En el caso de los tRNA, *Salmonella Gallinarum* presentó un número ligeramente superior (68) en comparación con *Salmonella Pullorum* (65).

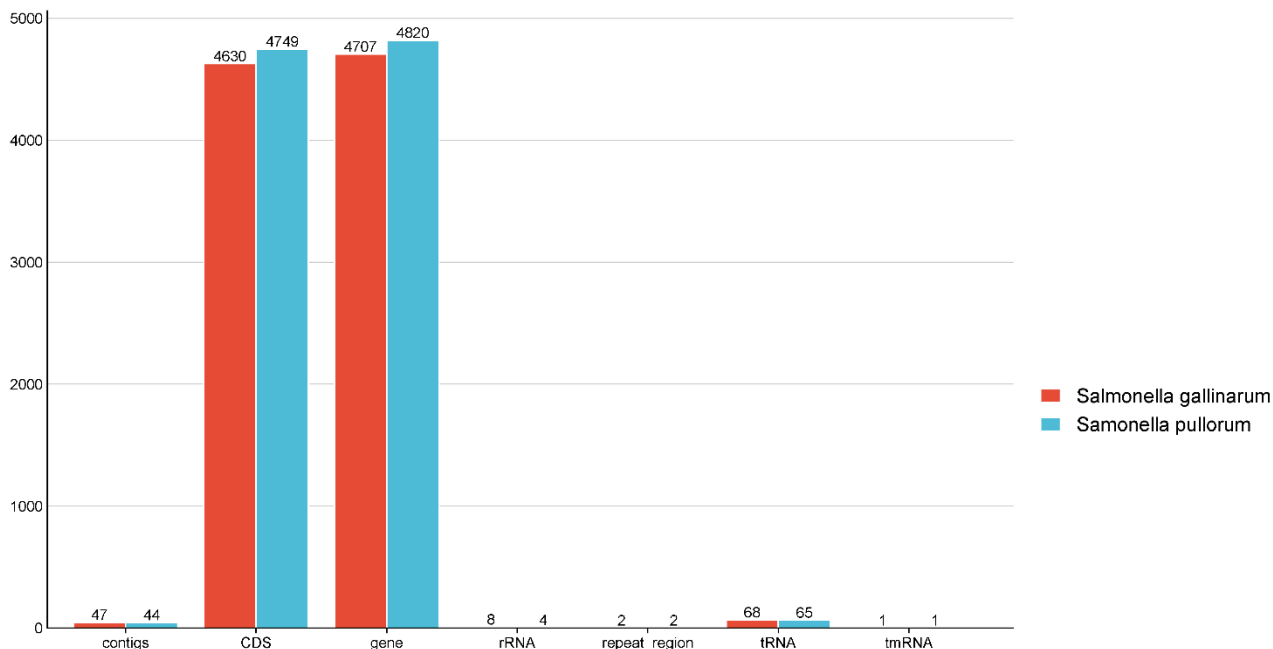


Figura 7. Comparación de las principales características genómicas anotadas en cepas de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*. Se muestran los conteos de contigs, CDS, genes totales, rRNA, regiones repetidas, tRNA y tmRNA obtenidos tras la anotación genómica.

Para de *P. aeruginosa* se realizó la anotación genómica de 1,193 cepas, obteniéndose un promedio de 6,066 genes y 5,993 CDS por genoma (**Fig. 8**). Asimismo, se identificaron en promedio 66.76 genes de tRNA, 5.36 genes de rRNA, 1.64 regiones repetidas y 1 tmRNA por cepa. Estos valores reflejan la composición genómica típica de la especie, destacándose una elevada proporción de genes codificantes (CDS) y tRNA en comparación con otros elementos genéticos.

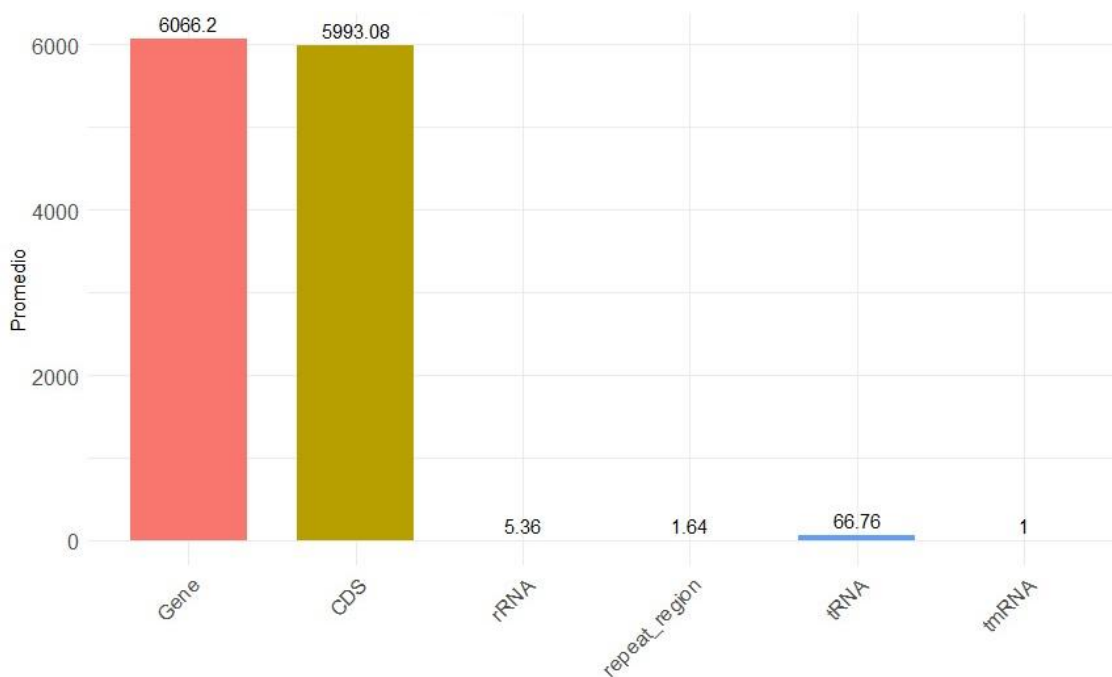


Figura 8. Promedio de elementos genómicos anotados en cepas de *P. aeruginosa*.

Con el objetivo de ubicar todos estos elementos en el genoma, se generó un mapa circular de la cepa PAO1, la cual es la más utilizada como referencia para *P. aeruginosa* ya que posee una calidad de ensamblaje bastante alto. Para esto, se utilizó a herramienta bioinformática de visualización genómica Proksee, en este mapa se representaron las distintas categorías de elementos genéticos identificados en el genoma de referencia (**Fig. 9**).

Alrededor del genoma se muestran las anotaciones correspondientes a diferentes genes y proteínas, entre los que se incluyen tanto genes conocidos como un número considerable de proteínas hipotéticas, distribuidas a lo largo de toda la secuencia genómica. La escala interna permite ubicar las posiciones genómicas expresadas en megabases (Mbp), abarcando la totalidad del genoma circular de la cepa PAO1.

Los CDS (secuencias codificantes) se muestran en color morado, mientras que los genes tRNA aparecen en naranja, los rRNA en azul y las tmRNA en morado, de acuerdo con la leyenda incluida en la parte inferior derecha de la figura 9.

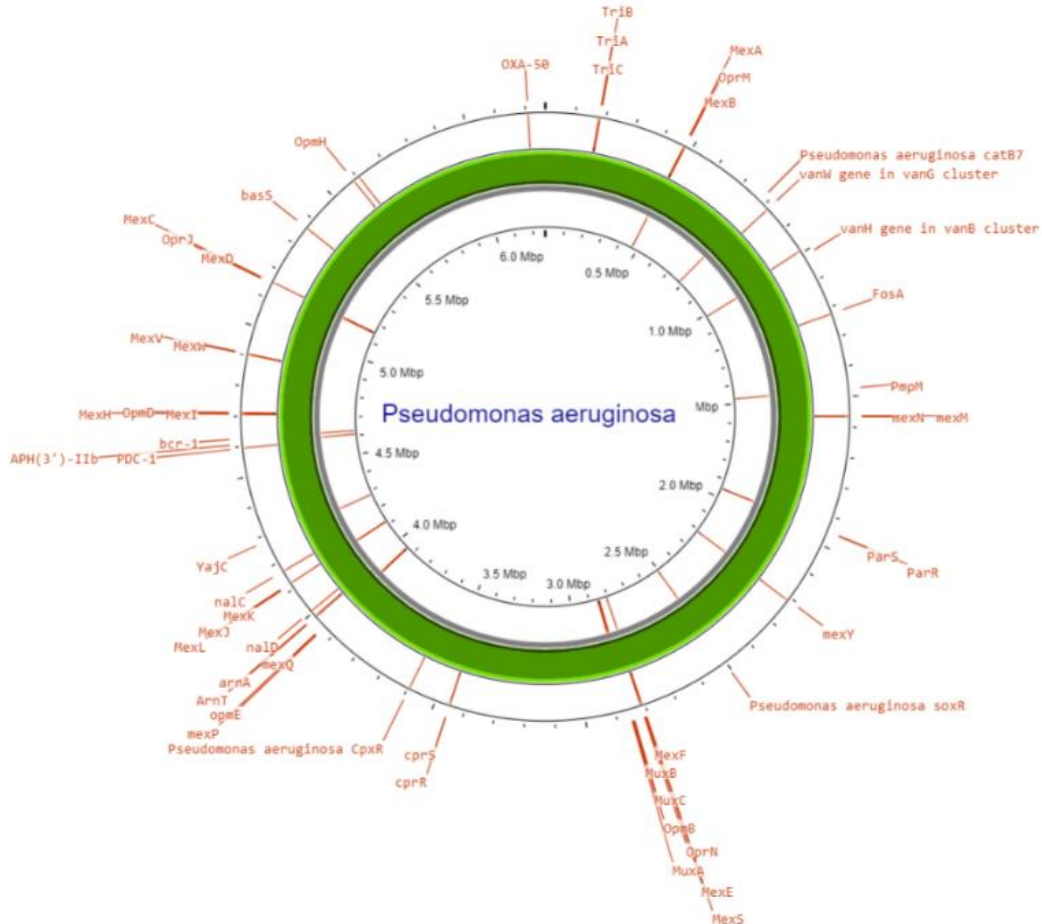


Figura 10. Distribución genómica de genes relacionados con resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa*.

7.3 Genómica comparativa

7.3.1 Pangenoma de *Pseudomonas aeruginosa*

Para el análisis pangenómico se utilizó *Roary* una herramienta muy eficaz para este tipo de análisis, el cual toma ensamblajes anotados en formato GFF (uno de los archivos de salida del Prokka). Esto permitió analizar grandes conjuntos de datos con miles de muestras en un tiempo relativamente corto, algo que sería inviable con métodos tradicionales. El análisis del pangenoma realizado a 1,193 cepas de *P. aeruginosa* reveló una enorme diversidad genética, con un total de 84,074 genes identificados. De estos, solo 1,534 genes (1.82%) forman parte del *core genome*,

es decir, están presentes en el 99% o más de las cepas. Esta baja proporción de genes centrales indica que, aunque hay un conjunto esencial compartido, la mayoría del contenido genético es variable entre cepas (Mosquera-Rendón *et al.*, 2016).

Los soft-core genes (entre el 95% y 99% de presencia) sumaron 2,344, mientras que los shell genes (presentes entre el 15% y el 95%) fueron 2,851. Estos genes, aunque no son conservados, aparecen con cierta frecuencia y probablemente estén relacionados con la adaptación a entornos específicos, resistencia antimicrobiana o variabilidad fenotípica (Kung *et al.*, 2010).

Resulta interesante la inmensa cantidad de genes cloud (genes presentes en la minoría de los genomas analizados) 77,345 para ser exactos, que representan más del 90% del pangenoma. Estos genes están presentes en menos del 15% de las cepas, lo que sugiere una enorme plasticidad genómica. Es muy probable que muchos de estos genes provengan de eventos de transferencia horizontal, como la adquisición de plásmidos, profagos u otros elementos móviles (Freschi *et al.*, 2019).

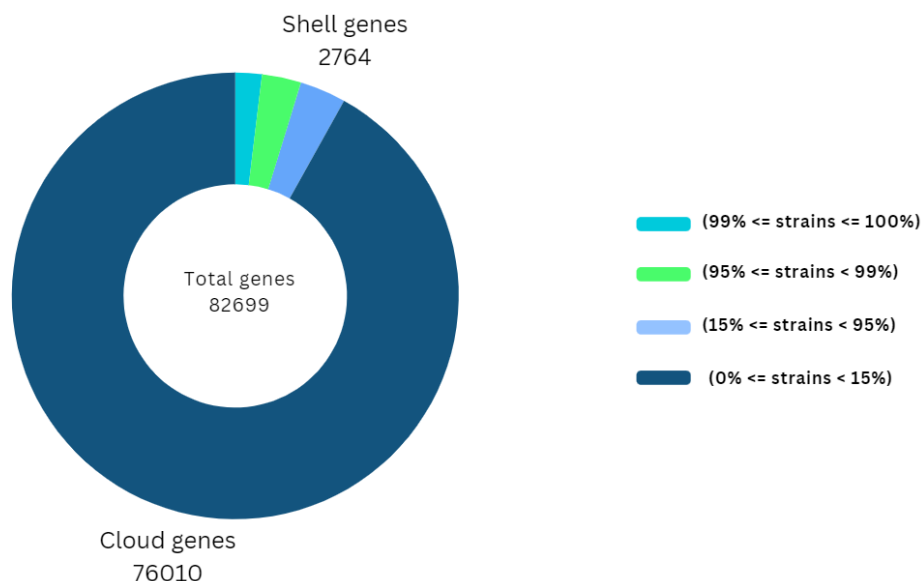


Figura 11. Distribución del pangenoma de *Pseudomonas aeruginosa* a partir del análisis de 1193 cepas. El gráfico muestra la clasificación de 82,699 genes totales en función de su frecuencia entre las cepas analizadas: core genomes (presentes en $\geq 99\%$ de las cepas), soft-core genomes (95–99%), shell genome (15–95%) y cloud genome (presentes en menos del 15%).

La representación visual generada mediante Phandango (**Fig. 12**) permitió explorar

de forma interactiva la composición del pangenoma de un total de 1193 genomas de *P. aeruginosa*. La figura está compuesta por un dendrograma jerárquico (panel izquierdo) construido a partir de la matriz de presencia/ausencia de genes generado por el roary, el cual revela una clara estructuración filogenética de las cepas analizadas, evidenciando agrupamientos relacionados con la similitud en su contenido genético.

En el panel central se observa la matriz pangenómica, donde cada fila corresponde a un gen y cada columna a un genoma individual. Las celdas en azul indican la presencia de genes y las blancas su ausencia, permitiendo diferenciar visualmente el genoma central (bloques azules continuos presentes en casi todas las cepas) del genoma accesorio, caracterizado por patrones de presencia heterogéneos. En la parte inferior se incluye la curva de acumulación de genes, que ilustra el crecimiento progresivo del pangenoma conforme se incorporan nuevos genomas al análisis.

Este patrón confirma la alta variabilidad genética de la especie, con un core genoma conservado relativamente estable y un componente accesorio extenso, consistente con el estilo de vida versátil y la capacidad adaptativa de *P. aeruginosa* frente a diversos ambientes y hospederos.

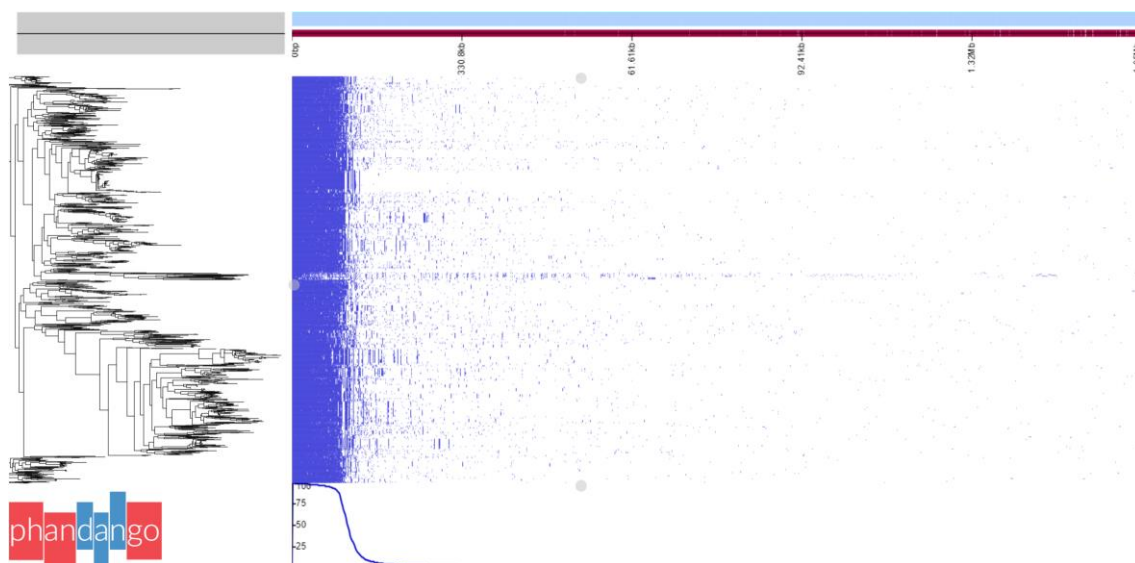


Figura 12. Visualización en phandango de datos pangenómicos *Pseudomonas aeruginosa* combinado con dendrograma obtenido a partir de presencia o ausencia de genes.

7.3.2 Pangenoma de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*

El análisis pangenómico combinado de cepas de *Salmonella Gallinarum* y *S. Pullorum* (**Fig. 13**), permitió caracterizar la estructura génica compartida y variable entre ambos serotipos. El pangenoma total estuvo conformado por 12 821 genes, distribuidos en 2 735 genes del *core genome* (presentes en el 99–100 % de las cepas), 921 genes *soft-core* (95–99 %), 1 645 genes de la fracción *shell* (15–95 %) y 7 520 genes de la fracción *cloud* (presentes en menos del 15 % de las cepas). Esta distribución muestra un núcleo relativamente conservado, característico de serovares monomórficos, acompañado de un componente accesorio considerable que refleja variaciones específicas entre aislamientos.

La visualización en *Phandango* (**Fig. 14**) permitió explorar la matriz de presencia/ausencia de genes para todas las cepas incluidas. En el panel izquierdo se observa un dendrograma jerárquico que refleja la agrupación de los genomas según su repertorio génico, donde no se evidencia una clara separación entre clados correspondientes a *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*. En la parte inferior se incluye la curva de acumulación de genes, que muestra la dinámica de crecimiento del pangenoma conforme se incorporan nuevos genomas.

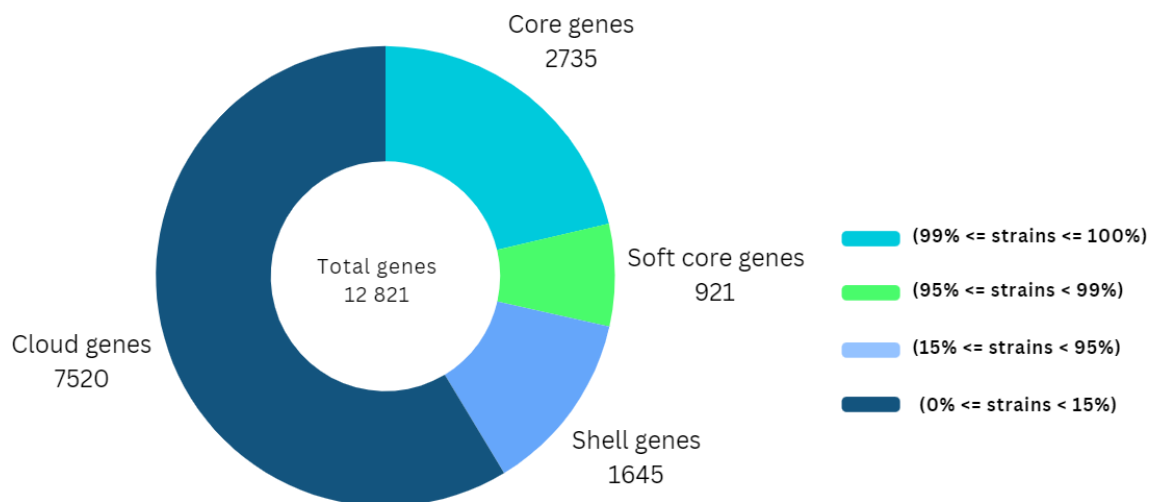


Figura 13. Pangenoma de los serotipos *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum*: En el gráfico se muestra la cantidad de total de genes que fueron identificados y la categoría en la que se encuentran.

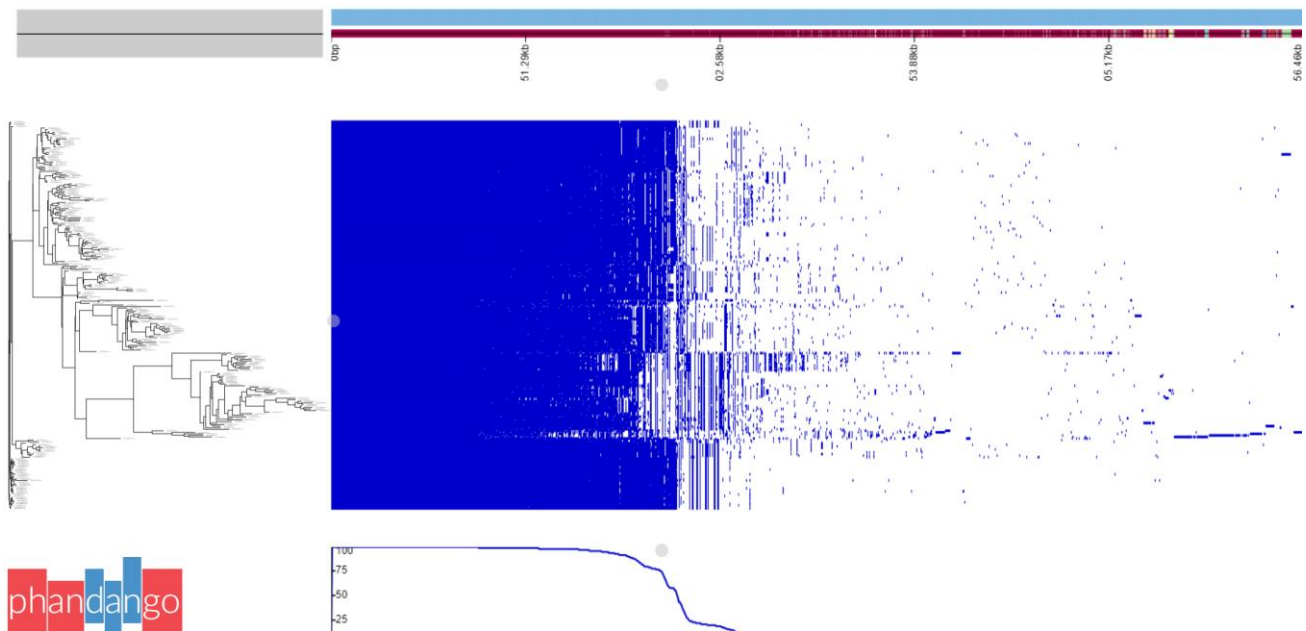


Figura 14. Visualización en phandango de datos pangenómicos de *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum* combinado con dendrograma obtenido a partir de presencia o ausencia de genes.

7.3.3 Blast en CGview

Se realizó una comparación genómica entre varias cepas de *Salmonella Gallinarum* (19) y *Salmonella Pullorum* (7) con la herramienta *blast* de la plataforma *en la plataforma CGview* (Fig. 15). Se seleccionaron los 25 genomas con mejor nivel de ensamblaje para ambos serotipos para obtener un análisis con menos sesgos. El análisis revela que gran parte del genoma está muy conservado entre las cepas. Esto tiene sentido, ya que muchas funciones básicas como el metabolismo, la replicación o la expresión genética tienden a mantenerse intactas en cepas de la misma especie y más en este caso que se trata de dos serotipos (Jacobsen *et al.*, 2011; Nuccio y Bäumler, 2014).

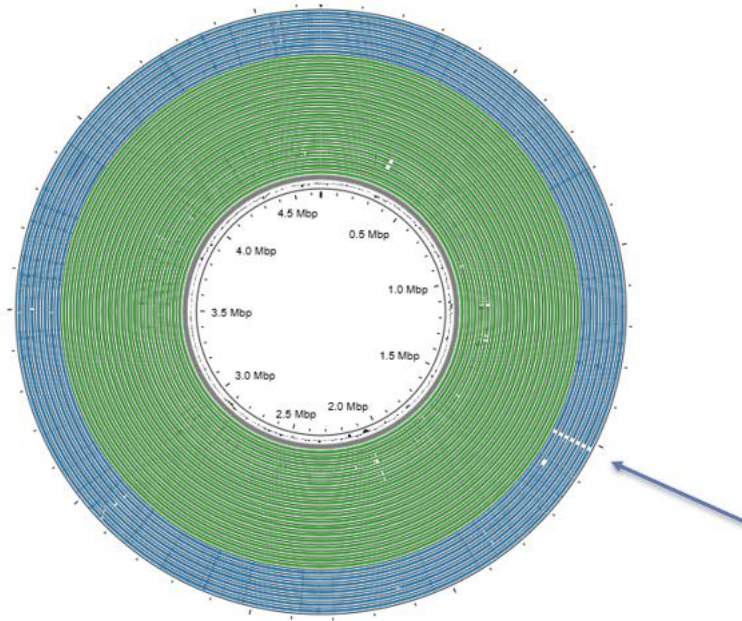


Figura 15. Genómica comparativa de *Salmonella gallinarum* (color verde) y *Salmonella Pullorum* (color azul) mediante visualización circular en el CGview. La flecha azul indica una región ausente en *Salmonella Pullorum*.

En el mismo análisis se identificó una zona que podría corresponder a una región genómica variable ausente en *Salmonella Pullorum* (**Fig. 16**). Esta región tiene una longitud de 10kb puede estar asociada con elementos como islas de patogenicidad, plásmidos, profagos o genes adquiridos por transferencia horizontal, lo que sugiere que, a pesar de la conservación general, existe una considerable plasticidad genómica. Y esta región puede ser clave para la identificación diferenciada de estos serotipos mediante PCR.

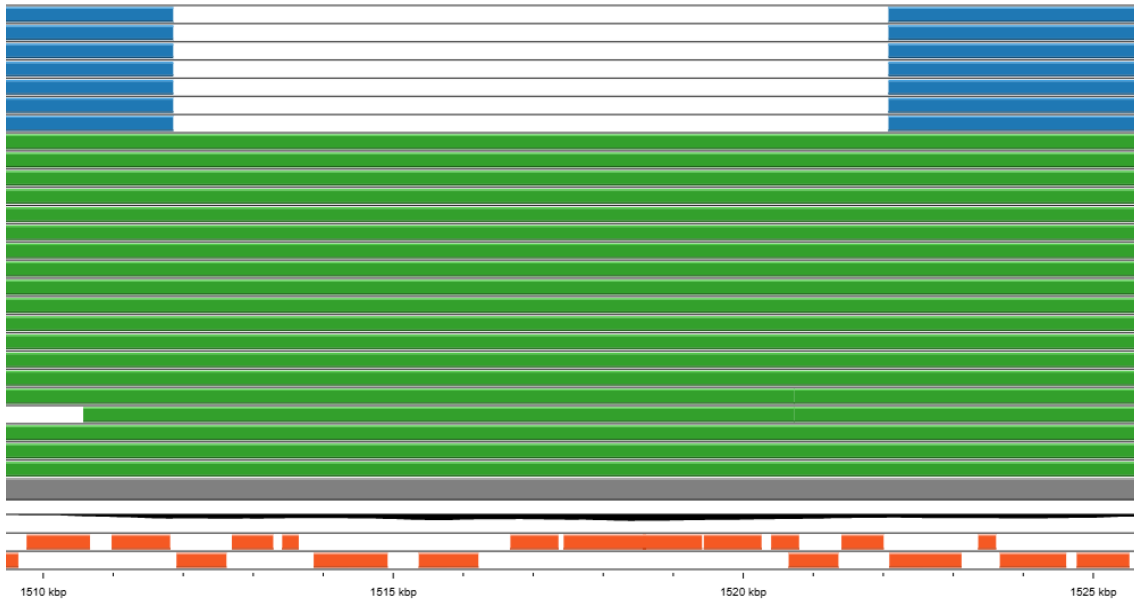


Figura 16. Anotación de la región ausente en *Salmonella pullorum*.

7.4 Análisis taxonómicos

Se realizó un análisis cofilogenético con el propósito de comparar la estructura filogenética derivada del genoma central (core genome) con el patrón de distribución génica obtenido del pangenoma (**Fig. 17**). Para ello, se analizaron 250 genomas, incluyendo 88 aislamientos de *Salmonella Gallinarum*, 162 de *Salmonella Pullorum*.

En la parte izquierda de la figura 17 se presenta el árbol filogenómico, mientras que en la parte derecha se muestra el árbol basado en la presencia y ausencia de genes. Ambos análisis revelaron una correlación topológica elevada (TreeDist = 0.694; nRF = 0.951), con una clara separación en dos clados principales, pese a provenir de diferentes tipos de información genómica.

- Las líneas azules corresponden a *S. Gallinarum* que poseen la región genética específica previamente identificada.
- Las líneas grises representan a los aislamientos de *S. Pullorum*, los cuales carecen de dicha región.
- Las líneas verdes indican aislamientos de *S. Gallinarum* que no presentan la región.

- Finalmente, las líneas rojas corresponden a las cepas externas agrupadas como una especie de outgroup.

La cofilogenia revela una estructura filogenética congruente entre ambos enfoques, destacando la formación de un clado definido de *S. Gallinarum* con la región previamente identificada, y otro clado que agrupa tanto a *S. Pullorum*, como a las cepas de *S. Gallinarum* carentes de ella. Esta organización sugiere que la presencia de la región analizada se asocia estrechamente con un linaje específico dentro de *S. Gallinarum*, lo que refuerza su potencial como marcador filogenético y epidemiológico.

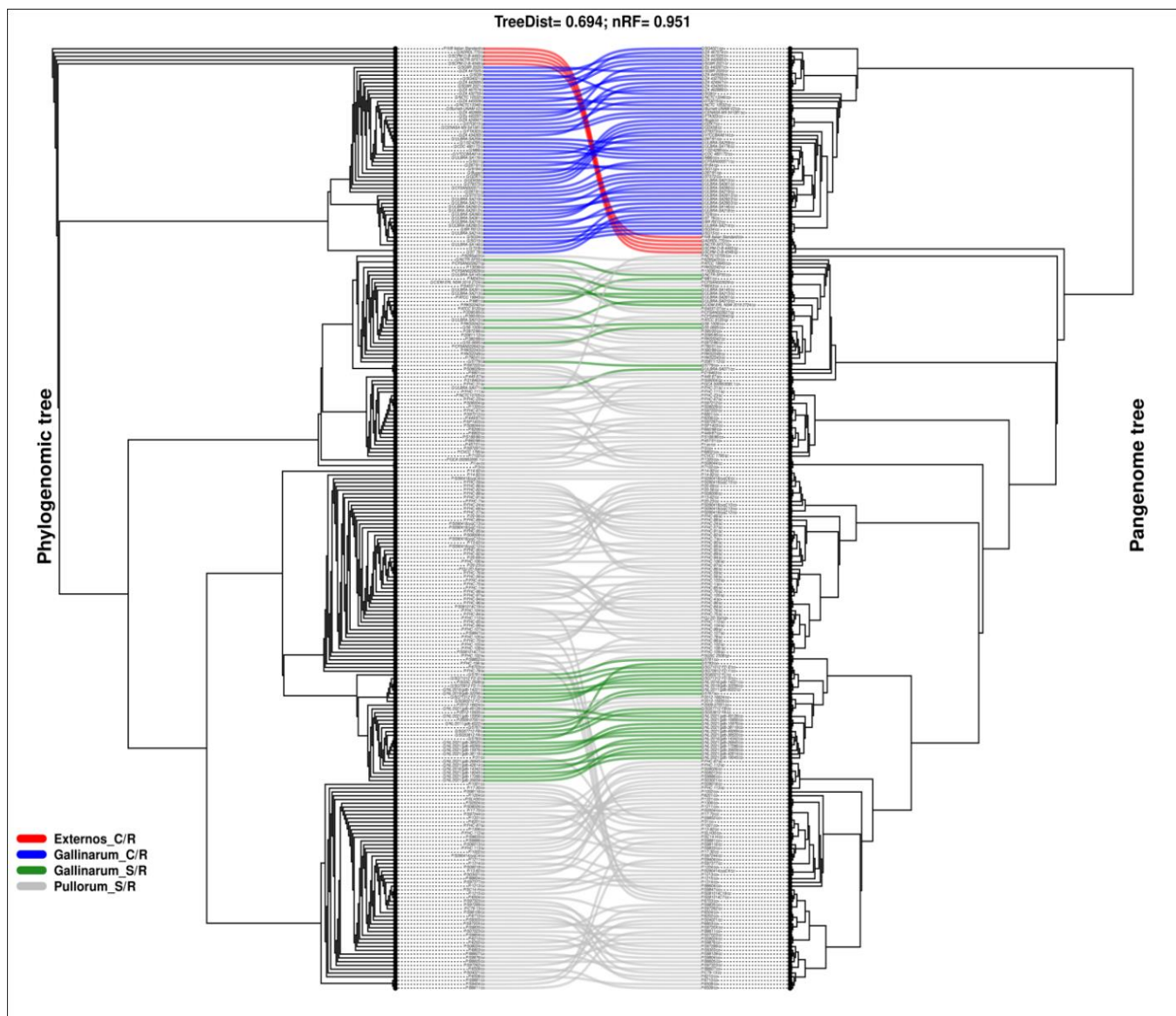


Figura .17. Cofilogenia basada en 250 genomas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum*.

7.5 Identificación de candidatos a marcadores moleculares.

Con el resultado de los análisis pan genómicos (matriz presencia y ausencia) se seleccionaron los genes que estaban presente en todos los genomas incluidos en los análisis. Como un segundo filtro, de esos genes conservados se seleccionaron además los que tenían un tamaño de 1000 a 2000 pb ya que esta longitud permite un equilibrio entre información filogenética suficiente y sobre todo amplificación manejable.

Con el objetivo de evaluar el potencial de determinados genes como marcadores moleculares, se realizaron análisis de alineamiento in silico utilizando la herramienta Blast empleando la base de datos genómica disponible en el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para ello, cada una de las secuencias génicas seleccionadas fue utilizada como consulta (query) para realizar búsquedas y alineamientos contra todos los genomas disponibles públicamente. Este enfoque permitió determinar de forma exacta la distribución y presencia de dichos genes en diferentes aislamientos bacterianos, así como identificar patrones de conservación o variabilidad entre cepas dados por los valores que arrojaba dicho análisis de cobertura e identidad. Específicamente para el caso de *P. aeruginosa* se identificaron 3 genes como potenciales marcadores moleculares.

El gen PotE anotado como BBOLJJI_01219, que codifica para el transportador de putrescina, mostró características destacadas que lo posicionan como un candidato sólido a marcador molecular. Los alineamientos in silico realizados contra todos los genomas disponibles en la base de datos del NCBI evidenciaron que este gen presenta una cobertura del 100 % y una identidad del 99,80 % para *P. aeruginosa* lo que indica un alto nivel de conservación y especificidad (**Fig. 18**).

Está involucrado en el transporte de poliaminas, una función esencial en el metabolismo bacteriano.

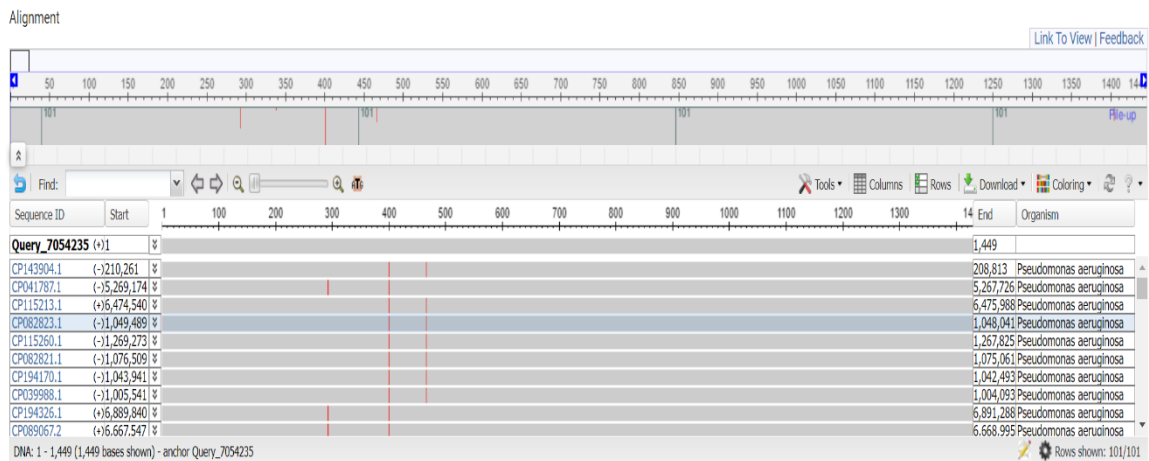


Figura 18. Resultados del alineamiento *in silico* del gen *potE* (BBOLJJI_01219) contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. El gráfico muestra la correspondencia entre la secuencia consulta (longitud: 1449 pb) *P. aeruginosa*, evidenciando alineamientos completos y de alta identidad en múltiples aislamientos. Cada línea horizontal gris representa un genoma, mientras que las barras rojas marcan las mutaciones/sustituciones encontradas.

El gen NADH oxidasa, anotado como BBOLJJI_03846 fue identificado como otro potencial marcador molecular. Los alineamientos *in silico* realizados contra todos los genomas disponibles en la base de datos del NCBI evidenciaron que este gen presenta una cobertura del 100 % y una identidad del 100 % para *P. aeruginosa* (**Fig. 19**). Esta enzima está involucrada en procesos esenciales del metabolismo energético bacteriano, lo que justifica su amplia conservación y su potencial como marcador molecular confiable.

Alignment

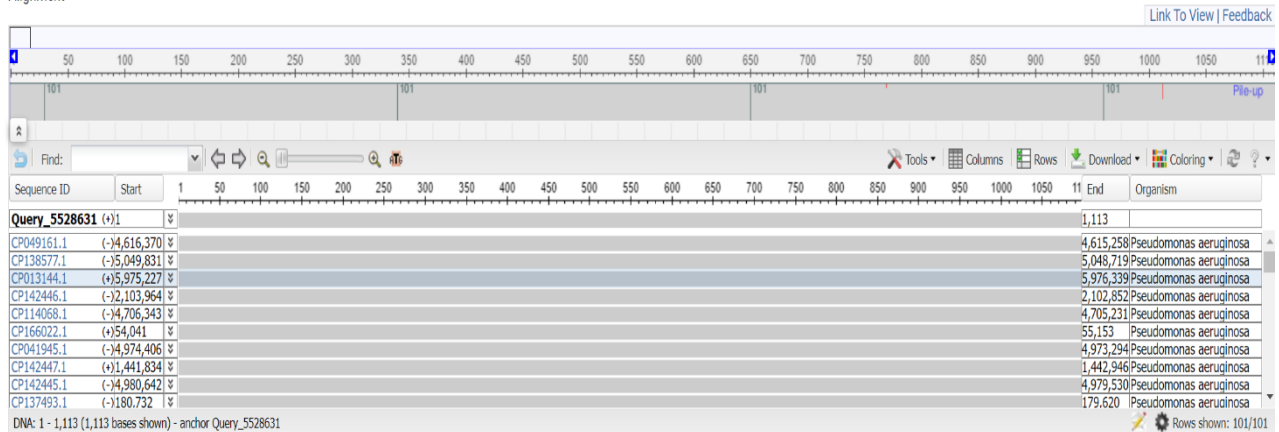


Figura 19. Resultados del alineamiento *in silico* del gen NADH oxidasa contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. El gráfico muestra la correspondencia entre la secuencia consulta (longitud: 1113 pb) *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciando alineamientos completos y de alta identidad en múltiples aislamientos. Cada línea horizontal gris representa un genoma.

El gen BBOLJJI_04271, que codifica la proteína FtsZ, mostró resultados consistentes con su papel como gen estructural altamente conservado. Los alineamientos *in silico* contra genomas completos de *P. aeruginosa* revelaron una cobertura del 100 % y una identidad del 99,80 % (**Fig. 20**). Este gen está directamente involucrado en la división celular bacteriana, y su alta conservación lo convierte en un marcador molecular robusto para análisis comparativos y estudios filogenéticos dentro de la especie.

Alignment

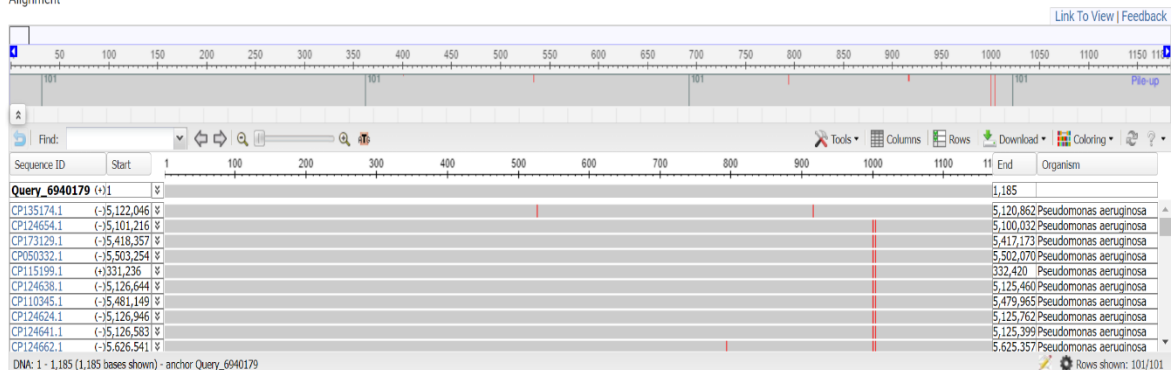


Figura 20. Resultados del alineamiento *in silico* del gen FtsZ contra genomas disponibles en la base de datos del NCBI. El gráfico muestra la correspondencia entre la secuencia consulta (longitud: 1185 pb) y *P. aeruginosa*, evidenciando alineamientos completos y de alta identidad en múltiples aislamientos. Cada línea horizontal gris representa un genoma y las líneas rojas verticales representan mutaciones o sustituciones.

El análisis comparativo entre los genomas de *Salmonella enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum* permitió identificar una región diferencial de aproximadamente 10 kb, presente exclusivamente en un subconjunto de cepas de *S. Gallinarum* y ausente en todas las cepas analizadas de *S. Pullorum*, así como en otras cepas de *S. Gallinarum* al parecer pertenecientes a linajes distintos. Esta región fue detectada mediante el análisis de presencia/ausencia de genes en el pangenoma y corroborada por la cofilogenia, en la que se observó una separación clara en dos clados principales: (i) cepas de *S. Gallinarum* portadoras de la región, y (ii) cepas de *S. Pullorum* y *S. Gallinarum* sin la región.

La ausencia total de esta región en *S. Pullorum* y su presencia constante en un conjunto específico de cepas de *S. Gallinarum* la convierten en un candidato sólido a marcador molecular diferencial (**Fig. 21**). Esta característica permite diseñar ensayos moleculares, por ejemplo, PCR convencionales o duplex dirigidos a fragmentos internos o a las secuencias flanqueantes de la región, con el fin de distinguir de manera rápida y precisa entre ambos serovares en estudios epidemiológicos o diagnósticos en la industria avícola.

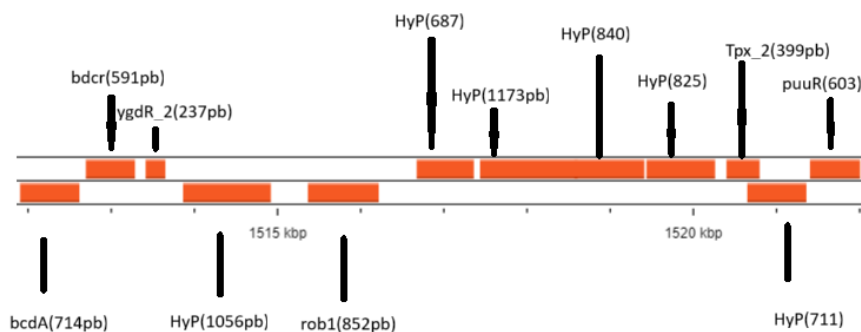


Figura 21. Representación esquemática de la región genómica diferencial identificada en *Salmonella Gallinarum*.

8. Discusión

En los últimos años el desarrollo acelerado de nuevas herramientas bioinformáticas y tecnologías de secuenciación ha transformado profundamente el estudio de los genomas bacterianos. Estas innovaciones hicieron posible abordar de manera más profunda aspectos relacionados con la evolución, diversidad genética, patogénesis y resistencia antimicrobiana de numerosos microorganismos de importancia médica y veterinaria. El aumento de reportes de secuencias genómicas y la disponibilidad de estas en distintas plataformas como el NCBI ha posibilitado la realización de estudios comparativos a gran escala que hace una década resultaban técnicamente muy complejos. En este trabajo el conjunto de análisis realizados permitió obtener una visión integral de la estructura genómica y la diversidad genética de *Pseudomonas aeruginosa* y de *Salmonella enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum*. Se construyó y depuró cuidadosamente una base de datos genómica, a partir de la descarga de secuencias de la base de datos pública NCBI y su posterior evaluación para descartar ensamblajes atípicos. CheckM posibilitó evaluar niveles de integridad y contaminación, mediante el uso de QUAST verificamos el contenido GC.

El contenido GC de un genoma constituye un indicador clave de la estructura genética y de la adaptación evolutiva de los organismos. En procariotas, este parámetro varía ampliamente entre especies y se ha vinculado con múltiples aspectos biológicos, como la estabilidad estructural del ADN, la resistencia térmica y la dinámica evolutiva de los genomas. Estudios recientes han demostrado que existe una correlación positiva entre el contenido GC y la temperatura óptima de crecimiento en numerosos linajes bacterianos, lo que sugiere que un mayor número de pares GC puede conferir mayor estabilidad frente a condiciones ambientales extremas (Hu *et al.*, 2022). De igual manera, Bentley y Parkhill, 2021 refieren que en zonas del genoma con un alto contenido GC se puede ver afectada la iniciación y progresión de la replicación del ADN, así como la apertura de las hebras en sitios promotores durante la transcripción. Estos efectos combinados hacen que la composición GC no solo sea un rasgo estructural del genoma, sino también un

determinante funcional que influye en la regulación y adaptación evolutiva de los microorganismos. Para *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizado por genomas grandes y flexibles, se han reportado contenidos GC que varían entre 65–67 %. Esto coincide con lo encontrado en este estudio para esta misma especie que fue un contenido GC de 66.3% aproximadamente (**Fig. 4**), lo que se asocia a una notable plasticidad genética y capacidad adaptativa a un gran rango de hospederos y a la vida libre. (Dechathai *et al.*, 2025). En cambio, *Salmonella Gallinarum* y *Salmonella Pullorum* presentaron un contenido GC de 52% aproximadamente. Ambos serotipos son patógenos específicos de aves por lo que se puede decir que se encuentran en un ambiente relativamente estable, aunque como se mencionó anteriormente en contenido GC no está determinado solamente por el modo de vida sino también involucra otros factores como son las cuestiones regulatorias.

La anotación genómica constituye un paso importantísimo en el análisis de secuencias, ya que permite identificar, caracterizar en cuanto a ubicación y funciones a los elementos genéticos presentes en un genoma. Además, la anotación facilita la comparación entre múltiples genomas, lo cual es indispensable para identificar regiones conservadas y variables, inferir funciones biológicas, y explorar mecanismos de adaptación, patogenicidad y resistencia antimicrobiana (Seemann, 2014; Tatusova *et al.*, 2016). En este contexto, la anotación de los genomas analizados en el presente estudio fue llevada a cabo con el programa PROKKA y constituyó la base para la identificación de genes y regiones con potencial valor como marcadores moleculares.

Los resultados obtenidos en la anotación muestran de manera general una alta similitud en la composición genómica básica de *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* (**Fig. 7**) lo cual es esperable dado que pertenecen al mismo serogrupo y están estrechamente relacionadas filogenéticamente. No obstante, se observan pequeñas diferencias en la cantidad de elementos genómicos, que podrían deberse a variaciones naturales entre cepas, calidad del ensamblaje o incluso a procesos de adaptación evolutiva.

El mayor número de CDS y genes totales en *S. pullorum* coincide con lo obtenido por Vaid *et al.*, 2021 quienes, mediante análisis comparativo de múltiples genomas completos, reportaron que *S. Pullorum* presenta un conjunto génico ligeramente más amplio que *S. Gallinarum*. Reportan también que dichas diferencias se asociaron principalmente a genes accesorios o regiones específicas y no al genoma central.

Para el caso de de *Pseudomonas aeruginosa* los resultados de la anotación genómica de varias cepas (1193) fueron que en promedio cada una tiene alrededor de 5993 CDS y 6066 genes (**Fig. 8**), indicando que es un genoma grande y muy activo, lo que le permite adaptarse a distintos ambientes y hospederos. Esto es bastante coherente con lo que han encontrado otros estudios como es el caso de Dechathai *et al* 2025 quienes reportaron un 5,607 CDS (secuencias codificantes) junto con un total de 5,683 genes. También se observó que la cantidad de genes de tRNA fue relativamente alta en promedio 66.76 lo cual tiene sentido, ya que esta especie necesita una buena cantidad de herramientas para la síntesis de proteínas de forma eficiente. Otros elementos, como los genes de rRNA (5.36), las regiones repetidas (1.64) y los tmRNA (1), se encontraron en menor cantidad, lo cual es común en muchas bacterias y coincide con lo reportado por Hoque *et al.*, 2022 para la cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque sean menos abundantes, estos elementos cumplen funciones importantes, por ejemplo, los rRNA en la síntesis de proteínas o los tmRNA en la corrección de errores de traducción.

En cuanto a la distribución cromosómica de determinantes de resistencia que fue otra de las anotaciones (**Fig. 10**), la dispersión de bombas de eflujo y β -lactamasas observadas coincide con las descripciones del genoma de referencia PAO1 por Stover *et al.* (2000), quienes demostraron que la resistencia intrínseca está integrada en el genoma central, más que concentrada en regiones móviles específicas. Esta organización explica la notable capacidad de la especie para resistir diferentes clases de antimicrobianos y desarrollar rápidamente fenotipos multirresistentes.

Las especies bacterianas presentan una organización genómica dinámica y heterogénea, producto de procesos como la transferencia horizontal de genes, la recombinación y la adaptación a diversos nichos ecológicos. Esta complejidad se analiza mediante el concepto de pangenoma (Tettelin *et al.*, 2005), que abarca el conjunto total de genes presentes en todas las cepas de una especie.

En *Pseudomonas aeruginosa*, distintos estudios han demostrado una estructura pangenómica abierta y con un alto componente accesorio. Gómez-Martínez *et al.*, 2023 analizaron 65 genomas seleccionados de aislamientos clínicos en México reportando un pangenoma de 20 911 genes, con 4 246 genes core (21,1%) y 14 058 genes cloud (67,2 %). Hu *et al.*, 2024 estudiaron 103 cepas clínicas aisladas en China y hallaron 18 913 genes, distribuidos en 4 962 core genes (26,24 %) y 12 558 cloud genes (66,40 %), confirmando la alta variabilidad de la especie. Por su parte, Dechathai *et al.*, 2025 compararon la cepa PSU9449 con 185 genomas adicionales, obteniendo 28 728 genes, con 3 976 core genes (13,84 %) y 22 204 cloud genes (77,29 %).

En esta investigación se realizó un análisis más amplio que incluyó 1 193 genomas, observándose un porcentaje de genes core de 1,8% y de genes cloud del 92 % y **(Fig. 11)**, un valor significativamente superior a los reportados en los estudios anteriores para esta categoría del pan genoma. Esta diferencia probablemente se deba a la inclusión de un mayor número de cepas y por lo tanto a la diversidad de los entornos de aislamiento, lo que incrementa la detección de genes únicos adquiridos por transferencia horizontal o específicos de nichos ecológicos muy particulares.

Aunque el cloud genome ofrece una idea clara de la plasticidad genética y de la capacidad adaptativa de *Pseudomonas aeruginosa*, desde el punto de vista de la identificación de marcadores moleculares, el componente más relevante es el core genome, es decir, el conjunto de genes compartidos por todas las cepas analizadas. En el caso de *P. aeruginosa*, se ha demostrado que el tamaño del core genome es excepcionalmente bajo en comparación con otras especies bacterianas.

Uno de los objetivos centrales del estudio fue la identificación *in silico* de genes

altamente conservados en *Pseudomonas aeruginosa*, con el propósito de evaluar su potencial como marcadores moleculares específicos. Tres genes destacaron por sus resultados: PotE (BBOLJJI_01219), NADH oxidasa (BBOLJJI_03846) y FtsZ (BBOLJJI_04271). Estos mostraron 100 % de cobertura e identidades entre 99,6 % y 100 % frente a todos los genomas analizados (**Figs. 18,19,20**), sin variantes significativas que comprometieran su conservación estructural. Dadas sus funciones esenciales (transporte de poliaminas, metabolismo energético y división celular), su distribución conservada y su posición cromosómica estable, estos genes representan blancos confiables para el desarrollo de ensayos moleculares estandarizables

El análisis pangenómico combinado de *Salmonella enterica* serovares *Gallinarum* y *Pullorum* permitió caracterizar la diversidad genética de 250 genomas, revelando una estructura genómica marcadamente distinta a la observada en *Pseudomonas aeruginosa*. Se identificó un total de 12 821 familias génicas, distribuidas en 2 735 genes core, 921 soft-core, 1 645 shell y 7 520 cloud. A diferencia de *P. aeruginosa*, en estos serovares aviares se observa un genoma central relativamente amplio, que representa una fracción considerable del repertorio génico total, reflejando su naturaleza monomórfica y la menor influencia de procesos de transferencia horizontal recientes (Thomson *et al.*, 2008).

Este patrón concuerda con observaciones históricas sobre estos serovares. Thomson *et al.*, 2008 describieron que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* presentan una alta conservación genómica y una divergencia limitada, atribuida a su especialización en aves de corral y a su evolución clonal a partir de un ancestro común de *S. Enteritidis*.

Sin embargo, la presencia de 921 genes *soft core* (95–99% de las cepas) y 1645 genes *shell* (presentes en 15–95% de las cepas) indica que existe cierta variabilidad entre cepas de los dos serotipos, probablemente relacionada a la interacción con el hospedador o a la evolución clonal. Esto concuerda con estudios previos que han sugerido que, a pesar de compartir una gran parte del genoma, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* han seguido trayectorias evolutivas distintas, en parte debido a su

especialización a diferentes fases de infección en aves (Vaid *et al.*, 2021). En este contexto cabe destacar que las diferencias entre ambas líneas no se deben a una gran variabilidad global, sino a regiones génicas diferenciales puntuales que marcan eventos de ganancia o pérdida específicos.

La cofilogenia (**Fig.17**), construida mediante la comparación de un árbol basado en el core genome y otro basado en presencia/ausencia de genes, mostró una alta congruencia topológica, dividiendo las cepas en dos clados principales:

1. Un clado formado por cepas de *S. Gallinarum* que contienen una región diferencial de aproximadamente 10 kb,
2. Un clado que agrupa a *S. Pullorum* junto con cepas de *S. Gallinarum* que carecen de dicha región.

Este patrón filogenómico sugiere que la región diferencial es un marcador de linaje dentro de *S. Gallinarum*, adquirida probablemente en un ancestro específico y mantenida de forma estable. La clara separación entre ambos clados a pesar de basarse en métodos distintos (core vs presencia/ausencia) refuerza la idea de que esta región posee un valor diagnóstico y evolutivo significativo, pudiendo ser empleada para diferenciar rápidamente cepas de ambos serovares.

Además, la conservación general observada en los mapas CGView (**Fig. 15**), con pocas “ventanas” de variabilidad concentradas en regiones específicas, es consistente con una estructura genómica estable y con la ocurrencia de eventos de recombinación limitados. Este patrón coincide con los hallazgos de Thomson *et al.* 2008, quienes demostraron que estos serovares evolucionan principalmente a través de pérdida génica progresiva y mantenimiento de un repertorio genético conservado, más que por la adquisición masiva de material genético externo.

En este sentido, los alineamientos realizados en NCBI/BLASTn de los genes presentes en la región de 10 kb (**Fig. 21**) confirmaron que estos se encuentran principalmente en los serotipos *Gallinarum*, *Enteritidis* y *Typhimurium*, con un alto grado de identidad y cobertura, y están ausentes en *Salmonella Pullorum*. Esto evidencia que, si estos serotipos evolucionaron a partir de un ancestro común, como

ha sido reportado, la ausencia de esta región en *S. Pullorum* se debe probablemente a un proceso de pérdida génica progresiva, asociado a adaptaciones específicas al hospedero.

9. Conclusiones

La anotación genómica realizada con Prokka permitió caracterizar la composición genética básica de cada especie y serovar. *P. aeruginosa* mostró un genoma grande y altamente activo, con un promedio de 6 066 genes y 5 993 CDS, además de una elevada proporción de genes tRNA, lo que respalda su conocida plasticidad genética y capacidad adaptativa. En contraste, *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* presentaron genomas más compactos, con diferencias cuantitativas ligeras en el número de CDS y genes totales, lo que refleja su estrecha relación filogenética y su evolución especializada en aves.

En *Pseudomonas aeruginosa* la incorporación constante de nuevos genomas revela continuamente genes accesorios y únicos, lo cual es indicativo de una alta plasticidad genética y de una intensa participación de mecanismos de transferencia horizontal, recombinación y adaptación a múltiples nichos ecológicos. En términos evolutivos, evidencia que *P. aeruginosa* mantiene un núcleo funcional reducido pero estable, complementado con un repertorio accesorio amplio que le confiere versatilidad fenotípica y adaptativa, favoreciendo su supervivencia en ambientes clínicos, naturales y en distintos hospederos.

El análisis de presencia/ausencia de genes y el análisis filogenómico demostraron que los genomas reportados como *Salmonella Gallinarum* con la región ausente están más emparentados con *Salmonella Pullorum* que con *Salmonella Gallinarum*. Esto sugiere que probablemente estén mal clasificados y refuerza el valor de esta región como marcador molecular e incluso taxonómico

Lista de genomas mal clasificados:

GCA_003874035.1,GCA_003874095.1,GCA_006519805.1,GCA_006522275.1,GCA_006522295.1,GCA_010685845.1,GCA_013259225.1,GCA_015024675.1,GCA_015024685.1,GCA_015024695.1,GCA_015024735.1,GCA_021103795.1,GCA_0

21103815.1,GCA_022414755.1,GCA_022414955.1,GCA_022414975.1,GCA_022415015.1,GCA_022415245.1,GCA_022415505.1,GCA_032134675.1,GCA_032135155.1,GCA_032135475.1,GCA_032136135.1,GCA_032136175.1,GCA_032136195.1,GCA_032136215.1,GCA_032136235.1,GCA_032136255.1,GCA_032136275.1,GCA_032136295.1,GCA_032136315.1,GCA_032136335.1,GCA_032136435.1,GCA_032152735.1

10. Perspectivas

La caracterización genómica y pangenómica realizada en este estudio abre múltiples líneas de trabajo científico y aplicado que pueden contribuir significativamente al fortalecimiento de la salud aviar en México. Una de las principales perspectivas es el diseño y estandarización de ensayos moleculares basados en los genes conservados de *P. aeruginosa* y en la región diferencial de *S. Gallinarum*, evaluando su sensibilidad, especificidad y reproducibilidad en paneles aviares.

Sería valioso ampliar la base de datos con genomas secuenciados y reportados recientemente y repetir los análisis pangenómicos y filogenómicos para monitorear la estabilidad de los marcadores en el tiempo y detectar la aparición de nuevos determinantes genéticos de importancia sanitaria.

Determinar la función específica de la región de 10 kb identificada y esclarecer qué ventajas o desventajas confiere en términos de patogenicidad a *Salmonella gallinarum* respecto a *Salmonella pullorum*.

Finalmente, futuras investigaciones podrían orientarse a explorar la dinámica temporal y geográfica de las poblaciones de *Salmonella* y *Pseudomonas* en México, integrando datos genómicos con información epidemiológica y productiva. sanitaria del sector avícola nacional.

11. Referencias bibliográficas

- Abd El-Ghany, W. A., Khalil, S. A., & El-Mashad, A. A. (2021). Pathogenic potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from poultry and its environment in Egypt. *Veterinary World*, 14(4), 1050–1057.
- Abdullahi, I. N., Iregbu, K. C., & Olabisi, O. F. (2013). Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates using oprL gene as a marker. *Journal of Microbiology Research*, 3(6), 254–258.
- Aghamollaei, H., Heiat, M., Razei, A., & Mirnejad, R. (2015). Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by PCR targeting oprL gene. *Iranian Journal of Public Health*, 44(1), 45–51.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., ... & McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517–D525.
- Algammal, A. M., El-Kholy, A. W., Riad, E. M., Mohamed, E. M., Elhaig, M. M., ... & Hetta, H. F. (2023). Prevalence and virulence determinants of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from poultry. *Poultry Science*, 102(2), 102256.
- Aljebory, A. H. M. (2018). Detection of some virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical samples. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 7(6), 87–94.
- Almeida, A., Nayfach, S., Boland, M., Strozzi, F., Beracochea, M., Shi, Z. J., ... & Finn, R. D. (2019). A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome. *Nature Biotechnology*, 37(8), 861–869.
- Amsalu, A., Sapula, S. A., Lopes, B. S., & Toleman, M. A. (2021). Worldwide distribution and environmental origin of the *Pseudomonas aeruginosa* bla_{AIM-1} gene. *Microbiology*, 167(5), 001066.
- An, J. H., Song, J., & Kim, M. (2019). Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection & Chemotherapy*, 51(4), 359–371.
- Andrew J. Page., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693.
- Azam, M. W., Khan, A. U., & Ahmed, S. (2019). Updates on the virulence and resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2521.

- Bakheet, T. M., & Torra, J. (2020). Protease production and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 69(9), 1211–1221.
- Barrow, P. A., & Freitas Neto, O. C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid—new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 40(1), 1–13.
- Barrow, P. A., Jones, M. A., Smith, A. L., & Wigley, P. (2012). The long view: Salmonellosis—The last forty years. *Avian Pathology*, 41(5), 413–420.
- Barrow, P. A., Lovell, M. A., & Berchieri, A. (2011). Infection by *Salmonella pullorum* of egg-laying hens: experimental and field observations. *Avian Pathology*, 40(5), 419–424.
- Beyaz, L., Gencay, Y. E., & Tunca, R. (2010). Pathological and immunohistochemical findings in chicks naturally infected with *Salmonella Gallinarum*. *Avian Pathology*, 39(5), 399–403.
- Bowers, R. M., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Harmon-Smith, M., Doud, D., Reddy, T. B., ... & Woyke, T. (2017). Minimum information about a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology*, 35(8), 725–731.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella nomenclature*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467.
- Burkovski, A., Koster, W., & Ernst, J. (2024). Modulation of host-pathogen interaction by *Salmonella* SPI-1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1342113.
- Cailer, C. (2021). Resurgence of fowl typhoid in wild birds. *Avian Diseases*, 65(2), 211–215.
- Calenge, F., Kaiser, P., Vignal, A., & Beaumont, C. (2010). Genetic control of resistance to salmonellosis and to other infectious diseases in fowl: a review. *Genetics Selection Evolution*, 42, 11.
- Chen, J., Zhang, M., Wang, Q., & Lou, X. (2016). A lateral flow immunoassay for *Pseudomonas aeruginosa* detection. *Analytical Biochemistry*, 493, 88–93.
- Coble, D. J., Sandford, E. E., Ji, T., Abernathy, J., Fleming, D., Zhou, H., ... & Lamont, S. J. (2011). Impacts of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection on the chicken spleen transcriptome. *BMC Genomics*, 12, 556.
- Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7696–7701.

- Dechathai, T., Singkhamanan, K., Yaikhan, T., Chusri, S., Pomwised, R., Wonglapsuwan, M., & Surachat, K. (2025). Comprehensive genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* PSU9449 isolated from a clinical case in Thailand. *Antibiotics*, 14(6), 530.
- De Vos, D., Lim, A., Jr, Pirnay, J. P., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., ... & Cornelis, P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6), 1295–1299.
- Dinev, I., Kanakov, D., Rusenova, N., & Denev, S. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* infections in poultry: pathological investigations. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 164(7), 360–365.
- EFSA. (2017). Scientific opinion on *Salmonella Gallinarum* and *S. Pullorum* in poultry. *EFSA Journal*, 15(2), 4692.
- Elsayed, M. S., Ibrahim, R. A., & El-Naggar, M. Y. (2016). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in poultry. *Veterinary World*, 9(8), 832–837.
- FAO. (2023). *Food Outlook: Biannual report on global food markets*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., ... & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 11(1), 109–120.
- Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5, 391.
- Galan, J. E., & Cossart, P. (2005). Host–pathogen interactions: a diversity of themes, a variety of molecular machines. *Current Opinion in Microbiology*, 8(1), 1–3.
- Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., & Redondo-Nieto, M. (2016). Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5507–5519.
- Gast, R. K., & Porter, R. E. (2020). Pullorum disease. In *Diseases of Poultry* (14th ed., pp. 190–199). Wiley-Blackwell.
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173.

Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* (9th ed.). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur.

Grzymajlo, K., Gosiewski, T., Adamska, D., & Sliwa-Dominiak, J. (2022). Host-microbiota interactions in *Salmonella* infections in poultry. *Frontiers in Microbiology*, 13, 890271.

Gupta, R., Malik, A., Rizvi, M., Ahmed, S. M., & Singh, A. (2011). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research in Bacteriology*, 4(1), 1–10.

Habeeb, M. A., Sarwar, Y., Ali, A., Salman, M., Haque, A., & Noreen, Z. (2012). Detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from human infections. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 28(5), 871–874.

Harrington, S. M., Sapula, S. A., Amsalu, A., & Toleman, M. A. (2024). Global genomic diversity of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 15(3), e00767–24.

He, Q., Zhang, M., Zhao, Y., & Li, J. (2025). Small RNA-mediated regulation of *Salmonella* virulence. *Trends in Microbiology*, 33(1), 50–62.

Hoorfar, J. (2011). Rapid detection of foodborne pathogens. *Springer Science & Business Media*.

Hu, J., Bumstead, N., Barrow, P., Sebastiani, G., Olien, L., Morgan, K., & Malo, D. (1997). Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. *Genome Research*, 7(7), 693–704.

Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., ... & Weill, F. X. (2014). Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 165(7), 526–530.

Jain, C., Rodriguez, R. L., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114.

Jia, B., Liu, Y., Li, J., & Zhang, Q. (2025). Evolution of resistomes in avian *Salmonella*: an adaptive strategy. *PLoS Pathogens*, 21(2), e1012317.

Juan, C., Zamorano, L., & Oliver, A. (2017). Impact of chromosomal mutations on β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), e01577–16.

Kebede, F. (2010). *Pseudomonas* infection in chickens. *Ethiopian Veterinary Journal*, 14(1), 123–138.

- Kothari, V., Sharma, S., Padia, D., & Pandya, H. (2022). *Pseudomonas*: A diverse bacterial genus with environmental significance. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 785–799.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 621–641.
- Laborda, P., Manzano, M., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Rodríguez-Baño, J., & López-Cerero, L. (2021). Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clones in Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(8), 1208–1215.
- Li, H., Chen, Y., & Li, J. (2020). Co-exposure to PM_{2.5} and *Pseudomonas aeruginosa* aggravates lung inflammation through NF- κ B activation. *Environmental Research*, 191, 110214.
- Li, Y., Zhang, R., Hu, J., ... & Wang, Q. (2021). Retrospective data insight into the global distribution of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 73(6), e1437–e1445.
- Liu, L., Xu, S., Wang, X., ... & Luo, X. (2016). Electrochemical biosensor for detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 684–690.
- Lozica, L., et al. (2024). Epidemiological updates on fowl typhoid and pullorum disease. *Avian Pathology*, 53(1), 67–78.
- Lynch, J. P., & Zhanel, G. G. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic strategies. *Drugs*, 82(5), 479–498.
- Mahmoud, A. E., Salem, H. M., & Abdel-Mohsein, H. S. (2022). Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in poultry. *Poultry Science*, 101(12), 102218.
- Majchrzak, M., Kubiak, M., & Dudek, B. (2014). PCR-based methods for detection of *Salmonella* serotypes. *Medycyna Weterynaryjna*, 70(3), 179–183.
- Marinus, M. G., Casadesus, J., & Low, D. (2012). Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: *Salmonella* as a model. *Frontiers in Microbiology*, 3, 288.
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589–594.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39.

Mosquera-Rendón, J., Rada-Briceño, B., Cárdenas-Brito, S., Corredor, M., Restrepo-Pineda, E., & Benítez-Páez, A. (2016). Pangenome-wide and molecular evolution analyses of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*, 17, 45.

Muñoz, N., Diaz, M., Rodriguez, I., & Lagares, A. (2010). PCR-based serotyping of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3254–3259.

Niemann, G. S., Brown, R. N., & Carlson, S. A. (2011). CigR: a conserved *Salmonella* gene required for virulence. *Infection and Immunity*, 79(1), 200–210.

Nuccio, S. P., & Bäumlér, A. J. (2014). Comparative analysis of *Salmonella* genomes identifies a metabolic network for escalating growth in the inflamed gut. *mBio*, 5(2), e00929–14.

Ojima, S., Kobayashi, H., & Hara-Kudo, Y. (2021). Experimental infection of chickens with *Salmonella Gallinarum*: immune responses and pathology. *Avian Pathology*, 50(3), 231–239.

Park, M.-K., et al. (2001). Differentiation of *Salmonella Gallinarum* and *S. Pullorum* by nucleotide polymorphism in rfbS gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1611–1613.

Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., DuLong, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive unexplored human microbiome diversity revealed by over 150,000 genomes from metagenomes spanning age, geography, and lifestyle. *Cell*, 176(3), 649–662.

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055.

Paz, J. C., Torres, J. A., & Rodríguez, J. M. (2019). Host-pathogen interactions in avian *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Veterinary Microbiology*, 230, 43–51.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1132–1147.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas revisited*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(2), 229–256.

Peña, C., Suarez, C., Gozalo, M., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., ... & Spanish Network for Research in Infectious Diseases (2013). Prospective multicenter study

of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), 2451–2455.

Pico-Rodríguez, L., Ortiz-Rojas, L. Y., & Galindo-Castro, I. (2023). Role of SPI-2 in the intracellular survival of *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1198374.

Redmond, S. B., Chuammitri, P., Andreasen, C. B., Palić, D., Lamont, S. J. (2011). Chicken heterophils from commercially selected and non-selected genetic lines express cytokines differently after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure. *Poultry Science*, 90(4), 790–798.

Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126–19131.

Rodríguez-Noriega, E., Garza-Ramos, U., Barrios, H., Aguilar-Rodríguez, J., Velázquez-Acosta, C., Beltrán-Rodríguez, M., & Miranda-Novales, M. G. (2013). Emergence of OXA-141-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis patient in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1453–1454.

Sahu, P., & Ruhai, R. (2025). Immune evasion strategies and biofilm-mediated persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in avian hosts. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1567832.

Shaji, A., Barrow, P. A., & Wigley, P. (2023). Systemic tropism of *Salmonella Gallinarum* and *Pullorum* in avian hosts. *Avian Pathology*, 52(3), 301–312.

Shivaprasad, H. L., Barrow, P. A., Berchieri, A., Jr., & Wigley, P. (2013). Pullorum disease and fowl typhoid. In *Diseases of Poultry* (13th ed., pp. 678–693). Wiley-Blackwell.

Souza, V. P., da Costa, B. S., & Campos, P. A. (2021). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and clinical impact. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 2199–2213.

Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2004). PCR-based identification of *Pseudomonas aeruginosa* and differentiation from other *Pseudomonas* species found in cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), 2074–2079.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.

Tambassi, F., Andrade, P., & Da Costa, M. (2025). Degradation of SPI-1 and adaptation of avian serovars of *Salmonella*. *Infection and Immunity*, 93(1), e00451–24.

Tao, Y., Xie, Q., Liu, L., & Jiang, W. (2018). Magnetic relaxation switch aptasensor for the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 45–50.

Te Pas, M. F. W., Hulsege, I., Coster, A., Pool, M. H., Heuven, H. C. M., & Janss, L. L. G. (2008). Biochemical pathways analysis of microarray results: regulation of myogenesis in pigs. *BMC Developmental Biology*, 8, 18. (△ Este estudio aparece citado indirectamente en la parte de expresión génica).

Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M., & Euzéby, J. P. (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 521–524.

Thomson, N. R., Clayton, D. J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M. A., Stevens, M., Jones, M. A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard, D., Kingsley, R. A., Bignell, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdellah, Z., ... Parkhill, J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research*, 18(10), 1624–1637

Tolooe, A., Jalilvand, S., & Bahrami, A. (2025). Advances in sRNA-mediated virulence regulation and vaccine targets in *Salmonella*. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1553491.

Torsten Seemann. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069.

UNA. (2023). *Situación actual de la avicultura mexicana*. Unión Nacional de Avicultores. [Informe anual].

Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., & Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 148–154.

Vinuesa, P., & Contreras-Moreira, B. (2015). GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics. *BMC Bioinformatics*, 16, 1–11.

Wales, A. D., Davies, R. H., & Wray, C. (2023). A review of *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pullorum. *Avian Pathology*, 52(1), 1–16.

- Wang, Q., Li, H., & Zhang, Y. (2021). Retrospective data insight into the global distribution of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 73(6), e1437–e1445.
- Wigley, P. (2017). Salmonella host specificity: an evolutionary perspective. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1988.
- Withanage, G. S. K., Wigley, P., Kaiser, P., Mastroeni, P., Brooks, H., Powers, C., ... & Barrow, P. (2005). Cytokine and chemokine responses associated with clearance of *Salmonella enterica* serovar Pullorum infections in chickens. *Infection and Immunity*, 73(2), 820–828.
- Wu, H., Zeng, G., Liang, J., & Xu, H. (2015). Metabolic versatility of *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7133–7147.
- Xu, H., He, Q., & Li, Y. (2018). Development of PCR assays for the detection of *Salmonella pullorum* and *S. Gallinarum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30(2), 268–273.
- Yousefi, S., Nahaei, M. R., Farajnia, S., Aghazadeh, M., Iversen, A., Edquist, P., ... & Samadi Kafil, H. (2017). A review of *Pseudomonas aeruginosa* resistance mechanisms and epidemiology. *Microbial Pathogenesis*, 107, 218–224.
- Zarza, M., Pérez, M., & Aguilar, R. (2019). Mecanismos de resistencia antimicrobiana por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 45, e62.
- Zhao, Y., Li, X., Wang, M., ... & Xu, Z. (2023). Comparative pangenomics of *Pseudomonas aeruginosa* reveals conserved and variable gene repertoires. *Microbial Genomics*, 9(4), 000974.
- Zhou, Y., Zhang, M., Wang, H., & Zhao, L. (2020). Genetic divergence of *cigR* gene in *Salmonella* serovars and its potential as a marker for *S. Pullorum/Gallinarum*. *Veterinary Microbiology*, 244, 108666.
- Zhou, Z., Alikhan, N. F., Mohamed, K., & Achtman, M. (2022). The enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, antimicrobial resistance, and genome quality. *Wellcome Open Research*, 7, 142.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 15 de diciembre del 2025.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: : Identificación de marcadores moleculares para la detección de bacterias patógenas del género *Pseudomonas* y *Salmonella* en aves de corral, que presenta el **C. Lázaro Raúl Del Busto Benítez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ y co-dirección del DR. ARMANDO HERNÁNDEZ MENDOZA, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. EDGAR DANTAN GONZALEZ (DIRECTOR DE TESIS, CEIB-UAEM)

DR. ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA (CO-DIRECTOR DE TESIS, CIDC-UAEM)

DR. FERNANDO MARTINEZ OCAMPO (CEIB-UAEM)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (CEIB-UAEM)

DR. VÍCTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ (CEIB-UAEM)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

FERNANDO MARTÍNEZ OCAMPO | Fecha:2025-12-15 12:33:42 | FIRMANTE

MBi4AFRNvp88MEXdvOtrdKAwjVpDKz3xN//HI7z2LS1GN4M8JpGKnE6GOT1RIBIMisbYydkFbmnKggW3XumJ9POkE31jW1xiwTJNN9cz6vdAPVhgZRI1Op/9RhxvAp5sGj5ubhl6vajsJzqgwywKhWBP2rYXdJr4CTFB+5xGk5J50DZlqpSIRatbp7LFNoqhG9AI7TK4w91Y+eQMqDXMN+c6tgm84a9+/8GzMLq2WqVR6OyXTZ/W0AeDNMa4wr8BOQ+U24QIO7+PeutjQg7hHs/Gv+luHvXWvgVg+weOtdul6J3UMww4oS8U7Adxiliz6jrZvjXgSmpUnYzigZIA==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2025-12-15 12:36:18 | FIRMANTE

rKwkM3m2kEX35f9czXqC4NcqAdTn2tvEXKEhlSjn7izwa8Jn08t3PDpBOT3/woW+fRntXiKjahn9W+VKPfoGecjCw+rLa4CaxWyfjGHI3X60h1KfEYPJwwU0On+PQMV2eXb5sgDOIAze3U1h2ZxSNFG9vGu42xfGVbp+jCbF3xHm8oUwSm4vEY9aYsQET/zC36vO/jxLbcCNawA7NxtYsNlsjbcKJ2qKzBlzZnBmmd519Gv0iSEjclBYxmZY4MMVSo49ihsG58UlayeBeFt3yOvKuY7cF3lzGEcf5Q5zc+p+L3LbDJKXrmB6Z9AGI+js7KPHYK75WgsT70hfFmA==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2025-12-15 12:39:42 | FIRMANTE

GKsOdlVuMXB/DyQ9XgNaotjc2g1ZSn+vtAFS9PA8fYt5wYgSWIb3fwt4X+ERTor4jjapdWiS584W23SsAJ4aPhHXV0tUohSjqV1EuZGCY2v6aqPkicioWHnBWj1AKs05mR86ccY/JvyyFXjKbhQpyRYroXxpTPuueeZl8dJLhZliobKx+tzllkN0zWol05BrhwA2Za+zY9FPk9A5TJHQU83WooBk7/SH/WRRFFHfNmGo3p9K/1XJG20Ud6dX8268Z2mmg8CaoAr/J1pboL5K0uhZwIR/h5iuPA4dsTS4ts5HbG/IQIF0Do5z81Qy9zUkoUJ28n+4vG6RYyrdUKgzQ==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2025-12-15 13:36:26 | FIRMANTE

dF7xOp8AQtlA/orxpTRVsxGQVDENZf7zNLZELCWgqcs0EjnqYKscBSj3IbnpNKv1Ful7VrWv54RMUwbixXnW6LXPuNyy0hX7qBCzulcnFB/zVFXv8ZohfgOE26iAuEBM9/ZWYV SAL2q5+j7+A2EVSiCLuEwJGNbkRb8N4dySx30EMFKngprjNjyDSJx9RF76zs01ZhcreZw91OIAZc8t8DtDv1NAUD8kAmbUjlmCkasnj3qbKpL9+avf1SG2c/FkEhgWN3xSlpOdDm9jdZpKgj7FyFFXGjRe7VOHbDKerpCzRO5pHPucGnykOITRQMKNjKXMMUOovSsd3z0hf9w==

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2025-12-15 15:44:08 | FIRMANTE

eQISSLBTyTzS0P9iWslzcBnHGq7OE8isQ+poFE1dkd+BbAbeMVvRNFYMP1DjJsevOazuBfUqkMvKjnda62NO6Ucv4gFsmXyAWsPO1dSvsFVuSRNLqUNC1Gabbund6LXIHN UYOvbHmJ5izVeiUs3TJXi6UeCXzxyYfPcyHJMnc9rJF8Hf04pi2S6T1kp62Gu2yXRllANlr934OfTuxM0mksZTYaocCkG1PkAReV5m3EPCqfC+RcVpWfQkosoBqpEFC6qmNAq90rMf0LFs8zqy39DpYq7UU1D2y1IR/NpnBW0+TASJrc+w3KABSg2n4SG9RRbv/bvp7pi8ZXfEdw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



yFJgauRiO

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/30NQAPMzJKzHrcoOMnrVAM9mMmGBL5JE>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029