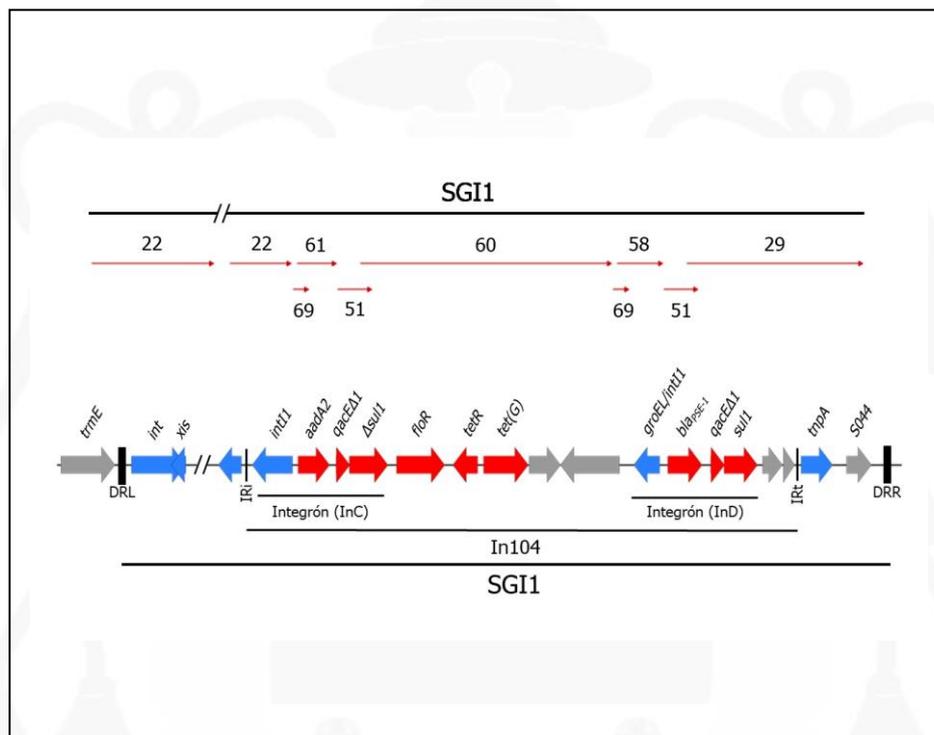


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOLOGÍA

**Análisis fenotípico y genómico de una cepa multirresistente de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium perteneciente al clon pandémico DT104**



**Rodrigo Suárez Lombao**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biología**

**Julio/2022**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## RESUMEN

*Salmonella* es un género de enterobacterias causante de una de las afecciones gastrointestinales más prevalentes en el mundo. Con más de 130 millones de casos anuales, el resultado de la infección depende de los factores de virulencia y resistencia de la bacteria y del estado del hospedador. El clon pandémico DT104 es una variante del serotipo Typhimurium de *S. enterica*, de gran relevancia a nivel mundial. Este se caracteriza por presentar un fenotipo de resistencia frente a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas (ACSSuT), codificado en un elemento genético movilizable conocido como Isla Genómica de *Salmonella* 1 o SGI1, localizado en el cromosoma bacteriano.

Este Trabajo de Fin de Grado tiene como objetivo la caracterización fenotípica y genética de la resistencia de la cepa LSP 181/13, perteneciente al clon DT104. El análisis bioinformático del genoma confirmó la asignación de la cepa a *S. enterica* serotipo Typhimurium y la asignó a la secuencia tipo ST19. Además, identificó los genes *bla<sub>PSE-1</sub>*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, asociados al fenotipo pentarresistente característico de este clon. Sin embargo, experimentalmente la cepa no mostró resistencia a tetraciclina, aunque sí a los demás antibióticos (ACSSu). Los genes resistencia se localizan en un integrón complejo de clase 1, denominado In104, dentro de SGI1 que mantiene todos los elementos necesarios para su movilización. Por ello, la isla puede actuar como vehículo de dispersión de la resistencia. Agravando el problema, la cepa posee el plásmido de virulencia pSLT, portador de genes que codifican numerosos factores de virulencia. La resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la medicina. El seguimiento y caracterización de bacterias resistentes, como la que ha sido objeto del presente trabajo, es importante para combatirlo.

## ABSTRACT

*Salmonella* is a genus of enterobacteria that causes one of the most prevalent gastrointestinal conditions in the world. With more than 130 million cases per year, the outcome of the disease depends on the virulence and resistance factors of the bacteria and the state of the host. The DT104 pandemic clone is a variant of *S. enterica* serotype Typhimurium, of great relevance worldwide. This clone is characterized by a resistance phenotype against ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclines (ACSSuT), encoded by a mobilizable genetic element known as *Salmonella* Genomic Island 1 or SGI1, located on the bacterial chromosome.

This End of Degree Project aims at the phenotypic and genetic characterization of the resistance in strain LSP 181/13, belonging to the DT104 clone. Bioinformatics analysis of the genome confirmed the assignment of the strain to *S. enterica* serotype Typhimurium and to sequence type ST19. In addition, it identified the *bla*<sub>PSE-1</sub>, *floR*, *aadA2*, *sul1* and *tet(G)* genes, associated with the pentaresistant phenotype characteristic of this clone. However, experimentally the strain did not show resistance to tetracycline, although it did show resistance to other antibiotics (ACSSu). The resistance genes were located in a complex class 1 integron, called In104, within SGI1, which maintains all the elements necessary for its mobilization. For this reason, the island can act as a vehicle for the dispersion of the resistance. Worsening the problem, the strain possesses the virulence plasmid pSLT, which carries genes encoding numerous virulence factors. Antibiotic resistance is one of the biggest challenges posed to modern medicine. The monitoring and characterization of resistant bacteria, such as the one that has been the subject of this work, is important in order to fight them.

## **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

El estudiante autor de este trabajo asegura su originalidad y su sola autoría, así como el adecuado uso y mención de todas las referencias bibliográficas e imágenes incorporadas al mismo.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1	El género <i>Salmonella</i> .....	1
1.2	Patogenicidad y virulencia en <i>Salmonella</i> .....	2
1.2.1	Factores de virulencia .....	2
1.2.2	Fiebre entérica .....	3
1.2.3	Gastroenteritis .....	3
1.3	Mecanismos de resistencia en <i>Salmonella</i> .....	5
1.4	Clon pandémico DT104 de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	7
1.4.1	Desarrollo histórico del clon pandémico .....	7
1.4.2	Isla Genómica de <i>Salmonella</i> 1 (SGI1).....	8
1.5	Objetivo del trabajo .....	10
<b>2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
2.1	Bacterias, medios y condiciones de cultivo .....	10
2.2	Antibiograma.....	11
2.3	Extracción de plásmidos.....	12
2.4	Secuenciación y ensamblaje del genoma .....	13
2.5	Análisis bioinformático .....	13
2.6	Reconstrucción de la región de resistencia de la isla genómica SGI1 y del plásmido pSLT .....	14
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
3.1	Determinación del fenotipo de resistencia.....	15
3.2	Identificación experimental de plásmidos.....	17
3.3	Análisis bioinformático del genoma de la cepa LSP 181/13 .....	17
3.3.1	Análisis de la calidad de las secuencias y ensamblaje del genoma.....	17
3.3.2	Identificación de la especie y tipificación bacteriana .....	19
3.3.3	Identificación de genes de resistencia: análisis de la isla genómica SGI1... ..	20

3.3.4	Identificación y caracterización plasmídica.....	23
4	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>25</b>
5	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>25</b>



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 El género *Salmonella*

Descubierto en 1885, el género *Salmonella* comprende en la actualidad dos especies: *S. enterica*, que incluye seis subespecies, y *S. bongori* (Fàbrega & Vila, 2013; Lan et al., 2009). El género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, siendo un bacilo Gram-negativo, móvil por flagelación peritrica, catalasa-positivo y oxidasa-negativo, capaz de fermentar la glucosa pero no la lactosa y de reducir los nitratos a nitritos (Murray et al., 2013). En este texto, nos centraremos en *S. enterica* subespecie *enterica* (I), siendo la de mayor relevancia clínica. Esto se debe a que el resto de subespecies (*S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI)) así como *S. bongori* (antigua subsp. V) se encuentran mayoritariamente en animales de sangre fría. Además, esta subespecie es la más diversa de todas, con 1531 serotipos de los 2579 que agrupa la especie, según el sistema de clasificación de Kauffmann-White-Le Minor. Este sistema de clasificación permite la caracterización por debajo del nivel de especie y subespecie, y se basa en tres tipos de antígenos de superficie: los antígenos O o somáticos, los antígenos H o flagelares y el antígeno K, Vi o capsular (Fàbrega & Vila, 2013). Los antígenos O son moléculas polisacáridicas que forman parte del lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Estos antígenos se dividen en los principales, que definen el serotipo, y los secundarios. Los antígenos H se relacionan por su parte con variaciones en la flagelina, una proteína estructural de los flagelos. La mayoría de los serotipos pueden sintetizar dos tipos alternativos de flagelina, denominados fase 1 y fase 2, por un mecanismo que se conoce como cambio de fase. Estos serotipos se denominan bifásicos, aunque existen serotipos que sólo sintetizan una de ellas y son por tanto monofásicos. El antígeno capsular es de naturaleza polisacáridica y únicamente se encuentra en unos pocos serotipos (Murray et al., 2013).

En la actualidad, especialmente en Europa, *S. enterica* subsp. *enterica* serotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*) es el serotipo más prevalente, seguido por el serotipo Typhimurium. Cabe destacar que este último ocupó durante muchos años la primera posición, con una prevalencia en Europa hasta del 60% (European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control, 2021). Importantes serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*, por ejemplo Typhi, Paratyphi B, Enteritidis y Typhimurium, pueden subdividirse en fagotipos en base a diferencias en cuanto a su susceptibilidad o resistencia frente a un panel de bacteriófagos



(Branchu et al., 2018). Este trabajo se centra en un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* fagotipo DT104.

## 1.2 Patogenicidad y virulencia en *Salmonella*

La infección por *Salmonella* cursa de forma claramente diferenciada según el serotipo causante. Así, se puede distinguir entre la llamada fiebre entérica, causada por variedades tifoideas, y la gastroenteritis, asociada a serotipos no-tifoideos (Gal-Mor et al., 2014; Murray et al., 2013).

### 1.2.1 Factores de virulencia

La bacteria dispone de un elevado número de factores de virulencia esenciales para producir la infección. Entre los más importantes se encuentran: los flagelos, las fimbrias y muchos otros frecuentemente codificados por islas de patogenicidad, profagos y plásmidos portadores de virulencia.

**Los flagelos** permiten a las bacterias desplazarse con movimientos rotatorios facilitando que la bacteria encuentre las células intestinales diana. Se componen de varias subunidades iguales de la proteína flagelina (Madigan et al., 2015).

**Las fimbrias** son filamentos proteicos que permiten la adhesión al epitelio intestinal y otras superficies y la formación de *biofilms* y, con ello, la persistencia en el intestino. Existen numerosas clases, como fimbrias Pef, Curli, Std o Lpf y la combinación de estas es específica de cada serotipo (Fàbrega & Vila, 2013).

**Las Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPIs)**, de las que hay más de 20, son elementos génicos cromosómicos en los que se encuentran genes de virulencia (Blondel et al., 2013). Cabe resaltar las SPI-1 y SPI-2, que codifican Sistemas de Secreción de Tipo III (T3SS) que inyectan proteínas efectoras en las células del hospedador (Fàbrega & Vila, 2013).

**Los profagos** son secuencias de ADN vírico que se insertan en el ADN cromosómico o plasmídico de la bacteria hospedadora (Madigan et al., 2015). Estos elementos pueden portar elementos no esenciales para el fago, pero que aportan distintas ventajas selectivas para la bacteria, incluyendo aquellas relacionadas con virulencia (Sabbagh et al., 2010).

**Los plásmidos** son elementos génicos extracromosómicos capaces de replicarse de forma autónoma. Se clasifican en grupos de incompatibilidad en función de su capacidad para coexistir y mantenerse en una misma línea celular, de forma que dos plásmidos que pertenezcan a un mismo grupo de incompatibilidad no pueden coexistir (Partridge et al., 2018). No codifican



genes esenciales para las bacterias, pero sí les pueden aportar ventajas selectivas en condiciones determinadas, como por ejemplo si llevan genes de virulencia y de resistencia. Algunos serotipos de *Salmonella*, como Typhimurium, Enteritidis y Dublin presentan plásmidos de virulencia específicos. El tamaño de estos varía entre las 50 y las 95 kb, pero todos contienen el llamado *locus spvRABCD*, que codifica para proteínas citotóxicas y otros factores de patogenicidad. Las más estudiadas son la proteína SpvB, que es un producto citotóxico capaz de inducir apoptosis en células epiteliales y en macrófagos al alterar la polimerización de la actina, y SpvC, que inhibe la respuesta inmunitaria y la síntesis de factores antiapoptóticos. Por otro lado, SpvR es un regulador que controla la transcripción del operón *spvABCD*. En el caso de *S. Typhimurium*, dicho plásmido presenta un tamaño de unas 95 kb, y recibe el nombre de pSLT (Fàbrega & Vila, 2013). Este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad IncF (Partridge et al., 2018).

### 1.2.2 Fiebre entérica

Como ya se ha mencionado, la fiebre entérica está causada por serotipos tifoideos, los cuales están casi exclusivamente adaptados al ser humano, como Typhi o Paratyphi (Murray et al., 2013), teniendo una prevalencia de 27 millones de casos y una mortalidad de 200.000 al año (Gal-Mor et al., 2014). Es una infección invasiva grave caracterizada por fiebre elevada y persistente, dolor abdominal, hepatoesplenomegalia, sarpullidos y cefaleas. Tras una incubación de entre 7 y 14 días aparecen los síntomas, y estos persisten hasta tres semanas (Gal-Mor et al., 2014). El patógeno se transmite por vía fecal-oral y, una vez en el íleon, atraviesa el epitelio intestinal a través de las células dendríticas y las células M que recubren las placas de Peyer. Finalmente es capturado por células fagocíticas como macrófagos. La bacteria sobrevive en el interior de las células parasitadas en una estructura denominada SCV o *Salmonella-Containing Vacuole*, dentro de la cual se reproduce y resiste la respuesta inmune del hospedador. Desde allí, ocurre la invasión sistémica alcanzando órganos como el bazo, el hígado, la vesícula biliar y la médula ósea (Coburn et al., 2007). Sin embargo, en un 1-4% de los casos de fiebre entérica, *Salmonella* puede colonizar de forma persistente la vesícula biliar haciendo que el paciente pase a ser un portador asintomático (Gal-Mor et al., 2014).

### 1.2.3 Gastroenteritis

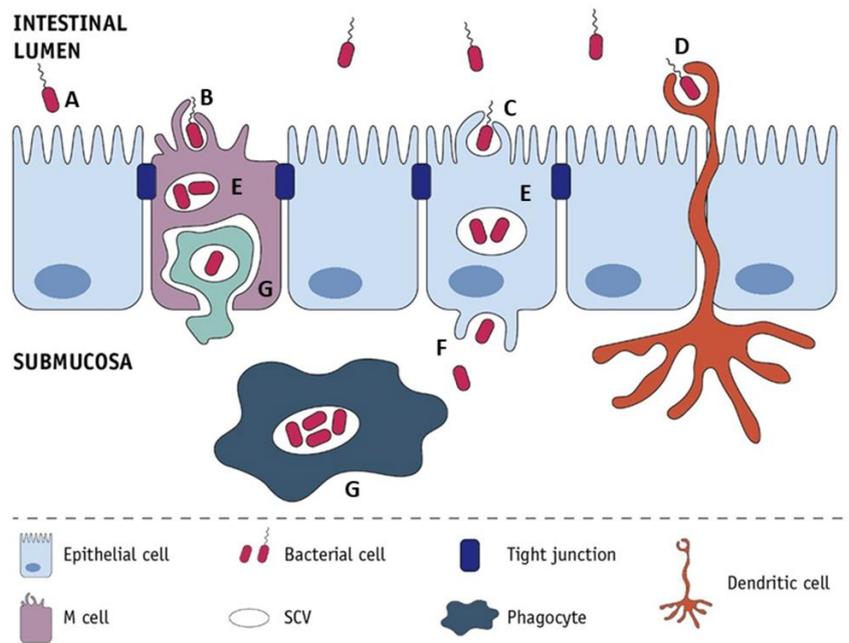
La gastroenteritis, por otro lado, es causada por serotipos no-tifoideos, zoonóticos y adaptados a una gran variedad de hospedadores. Es una forma de salmonelosis mucho más común y menos grave que la fiebre entérica, causando alrededor de 130 millones de casos y entre 100.000 y un millón de muertes al año (Branchu et al., 2018). La infección cursa con diarrea inflamatoria autolimitante y, en menor medida, fiebre, náuseas y dolor abdominal (Coburn



et al., 2007; Gal-Mor et al., 2014). Los síntomas aparecen tras 6 a 72 horas de incubación y en la mayoría de los casos se resuelven en una semana sin necesidad de tratamiento, debido a la eliminación de la bacteria por el sistema inmune del hospedador (Fàbrega & Vila, 2013). La fuente de la infección varía según la región, asociándose principalmente a fuentes de agua no potable en países en vías de desarrollo (GBD 2017 Non-Typhoidal Salmonella Invasive Disease Collaborators, 2019), y con alimentos contaminados de origen animal en países occidentales (Lan et al., 2009; Threlfall, 2000).

A diferencia de lo que se observa en la fiebre entérica, los síntomas de la gastroenteritis causada por serotipos no-tifoideos se asocian a una intensa reacción inmune innata que no se observa en las infecciones por serotipos tifoideos (Coburn et al., 2007). Un resumen del proceso infeccioso puede encontrarse en la Figura 1 (Dos Santos et al., 2019). Este se inicia cuando *Salmonella* llega al intestino (A), y usa distintos elementos para unirse al epitelio. La adhesión ocurre a través de diversas estructuras fimbriales y otras adhesinas no fimbriales codificadas en las SPI3 y SPI4, que permiten la unión a elementos de la matriz extracelular como la laminina, la fibronectina o el antígeno Lewis X de las células diana (Fàbrega & Vila, 2013). Esta interacción induce la expresión de los componentes de un T3SS codificado en la SPI1 (T3SS-1) (Coburn et al., 2007). Este sistema introduce al citosol de los enterocitos y de las células M (B, C) proteínas efectoras (codificadas por distintas SPIs), cuya acción lleva a que se deforme el citoesqueleto y se emitan unas proyecciones que acaban por internalizar al bacilo (E) (Fàbrega & Vila, 2013). En el citosol, la SCV permite de nuevo la multiplicación y supervivencia de la bacteria en las células del hospedador y el paso a través de ellas hasta la lámina basal del epitelio (F). El mantenimiento de esta estructura citoplasmática depende de la inyección al citosol de efectores por otro T3SS, codificado en este caso en la SPI2 (T3SS-2) (Fàbrega & Vila, 2013).

Los serotipos no-tifoideos pueden también atravesar el epitelio intestinal mediante células dendríticas (D). En la lámina propia, es fagocitada por los macrófagos (G), pero sobrevive igualmente en la SCV, donde se multiplica (Fàbrega & Vila, 2013). En esta fase, algunas de las proteínas efectoras inducen el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, así como la liberación de citoquinas, lo que desemboca en la diarrea inflamatoria (Gal-Mor et al., 2014). Generalmente, la infección queda confinada en el intestino, pero en un 5% de los casos puede volverse sistémica. Esto, comúnmente, ocurre en niños, ancianos, individuos inmunocomprometidos (por ejemplo, pacientes de VIH) y personas que padecen malaria o se encuentran en situación de desnutrición (Fàbrega & Vila, 2013).



**Figura 1. Proceso infeccioso causado por el serotipo no-tifoideo *S. Typhimurium*.** Inicialmente vemos adhesión al epitelio, con posterior entrada al citosol en la SCV y, finalmente, llegada a la lámina propia donde es fagocitada por macrófagos. (Tomado de Dos Santos *et al.*, 2019).

### 1.3 Mecanismos de resistencia en *Salmonella*

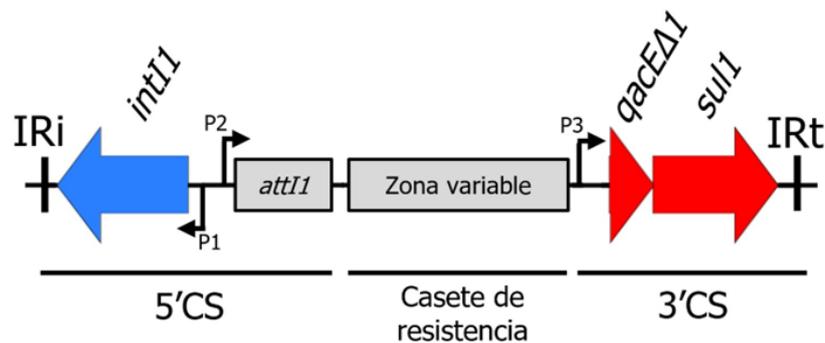
El tratamiento de las gastroenteritis en *Salmonella* no suele pasar de la rehidratación por vía oral e intravenosa para restaurar la pérdida de líquidos y electrolitos (Fàbrega & Vila, 2013). No obstante, en el caso de pacientes de riesgo (ancianos, niños y personas inmunocomprometidas) o en situaciones en las que se declare enfermedad invasiva se requiere el tratamiento con antibióticos. Con todo, la amplia diseminación de cepas de *S. enterica* resistentes a uno o varios antimicrobianos (especialmente de *S. Typhimurium*) aumenta la complejidad de las infecciones y su mortalidad (Fàbrega & Vila, 2013; Gal-Mor et al., 2014; Mulvey et al., 2006). La resistencia aparece cuando una bacteria logra evitar la acción del antimicrobiano, ya sea modificándolo o destruyéndolo, impidiendo su acceso al interior de la bacteria o expulsándolo mediante bombeo, o provocando cambios estructurales en las dianas celulares atacadas por el éste (Munita & Arias, 2016).

El origen de la resistencia es variado, y existen varios tipos. Primeramente, las bacterias pueden ser resistentes simplemente porque carecen del sitio de actuación del antibiótico (resistencia natural o intrínseca) (Munita & Arias, 2016). No obstante, en la mayoría de los casos el desarrollo de resistencia se asocia a mutaciones cromosómicas y, especialmente, la ganancia de genes adicionales mediante mecanismos de transferencia horizontal de genes (resistencia adquirida) (Munita & Arias, 2016; Partridge et al., 2018). En la captura, acumulación y dispersión de genes de resistencia intervienen numerosos elementos genéticos. Los más importantes son



los integrones, los elementos genéticos transponibles (secuencias de inserción y transposones), los Elementos Integrativos y Conjugativos (ICEs) y los plásmidos (Munita & Arias, 2016).

**Los integrones** son elementos genéticos implicados en la captación de casetes génicas, normalmente codificadoras de resistencia, carentes de promotor que además contienen un sitio de recombinación *attC*. Los integrones tienen un gen *intI*, que codifica una integrasa, un sitio de recombinación (*attI*) y un promotor. Mediante recombinación sitio-específica entre los sitios *attC* y *attI*, catalizada por la integrasa, las casetes pueden insertarse en ellos. Existen distintas clases de integrones, pero los de clase 1 son los más comunes en enterobacterias y los más importantes en resistencia. Estos integrones están delimitados por repeticiones invertidas de 25 bp (IRi e IRt) y poseen dos segmentos conservados, 5'CS y 3'CS (Partridge et al., 2018). Tal y como se muestra en la Figura 2, en el 5'CS se alojan *intI1*, el sitio de recombinación *attI1* y varios promotores, mientras que en el 3'CS encontramos genes de resistencia a desinfectantes (compuestos de amonio cuaternarios) y a sulfonamidas: *qacEΔ1* y *sul1* respectivamente. Entre ambos encontramos una región variable en la que pueden insertarse las casetes génicas de forma que puedan expresarse a partir de los promotores presentes en el integrón.



**Figura 2. Estructura de un integrón de clase 1.**

En la región 5'CS el gen *intI1* se indica en azul, mientras que en la región 3'CS los genes relacionados con resistencia, *qacEΔ1* y *sul1*, en rojo. Con "P" se indica un promotor: P1 permite la transcripción de *intI1*, P2 de las casetes de resistencia y P3 de *qacEΔ1* y *sul1*. (Basado en Drouin et al., 2002).

Los **elementos genéticos transponibles** son segmentos de ADN que pueden moverse de un sitio a otro del genoma, en una reacción catalizada por el enzima transposasa. La integración en el nuevo sitio ocurre de forma aleatoria y normalmente (aunque no siempre) se mantiene una copia del elemento en su localización original (Doublet et al., 2005). Las **secuencias de inserción (IS)** son los elementos genéticos transponibles más sencillos, con un tamaño menor de 2 kb, flanqueados por secuencias repetidas invertidas de unos pocos nucleótidos (IR), necesarias para la transposición, y con alguna excepción contienen únicamente el gen que codifica la transposasa (*tnp*). Los **transposones** son de mayor tamaño y, además de los genes requeridos para la transposición, alojan y movilizan genes de resistencia a antibióticos y también integrones. Pueden ser transposones compuestos o de clase I si están delimitados por



secuencias de inserción y complejos o de clase II si están flanqueados por secuencias repetidas invertidas (Partridge et al., 2018).

Mientras que integrones, secuencias de inserción y transposones pueden encontrarse en el cromosoma o en plásmidos, los **ICEs** (***Integrative and Conjugative Elements***) son amplias regiones del cromosoma que alojan numerosos genes, que pueden ser de virulencia o de resistencia a antibióticos. Pueden ser movilizados mediante su escisión del cromosoma de la bacteria donde se encuentran, formando una molécula de ADN circular, para a continuación transferirse a otra bacteria por conjugación e insertarse en un nuevo genoma. Este proceso ocurre por recombinación entre sitios específicos localizados en las moléculas donadora y receptora. Un ejemplo de ICE son las Islas Genómicas de *Salmonella* (SGIs; del inglés *Salmonella Genomic Island*), portadoras habituales de genes de resistencia como la SGI1, que se describirá posteriormente (Doublet et al., 2005). En ocasiones, algunos plásmidos son los responsables de la transferencia horizontal por conjugación de los ICEs, como por ejemplo los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncA e IncC (de Curraize et al., 2020).

Los **plásmidos** de resistencia son comunes entre las enterobacterias. Muchos de ellos pueden transferirse de unas bacterias a otras mediante el proceso de conjugación o pueden ser movilizados por plásmidos conjugativos que coexisten en la misma bacteria. Por ello desempeñan un papel esencial en la dispersión de genes de resistencia, muchos de ellos asociados a integrones, secuencias de inserción y transposones (Partridge et al., 2018).

## **1.4 Clon pandémico DT104 de *Salmonella* Typhimurium**

### **1.4.1 Desarrollo histórico del clon pandémico**

El clon *S. Typhimurium* fagotipo DT104 fue aislado inicialmente a partir de muestras humanas en Reino Unido en la década de los sesenta, siendo entonces sensible a los antibióticos (Lan et al., 2009; Mulvey et al., 2006; Threlfall, 2000). En la década siguiente, en Hong Kong, se aísla de humanos una cepa DT104 pentarresistente con un fenotipo característico de sensibilidad reducida a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina (ACSSuT) (Leekitcharoenphon et al., 2016). Cepas con este fenotipo de resistencia se detectan en Europa en los ochenta, aislándose de gaviotas y aves exóticas, de nuevo en Reino Unido (Lan et al., 2009; Leekitcharoenphon et al., 2016; Mulvey et al., 2006; Threlfall, 2000). Para finales de la década, el clon DT104 pentarresistente se había extendido ampliamente entre el ganado, afectando igualmente a humanos (Mulvey et al., 2006; Threlfall, 2000). A partir de entonces, se hizo dominante en muchas zonas, manteniendo esa prevalencia hasta, aproximadamente, la primera década del presente siglo (Leekitcharoenphon et al., 2016; Threlfall, 2000). La



diseminación global del clon DT104 multirresistente con toda probabilidad se asoció entonces, y aún hoy, al comercio de animales vivos, lo que explica que en países con una legislación más estricta sobre el tráfico de ganado existan menos casos locales en la actualidad (Lan et al., 2009; Leekitcharoenphon et al., 2016; Mulvey et al., 2006).

Si bien su expansión está ampliamente estudiada, el origen del clon DT104 aún es incierto. Recientemente, estudios basados en la tasa de sustituciones en el genoma por base y año sitúan la aparición de la forma sensible en torno a 1948 (Branchu et al., 2018; Leekitcharoenphon et al., 2016), mientras que la adquisición de la resistencia habría ocurrido alrededor de 1972, probablemente en Europa (Leekitcharoenphon et al., 2016). La presencia de una mutación ubicua que impide la utilización de alantoína por parte del clon DT104 y la homogeneidad en cuanto a la secuencia tipo (ST, establecida en base a los alelos correspondientes a unos pocos genes conservados de la bacteria) de todas las formas pentarresistentes (ST19) permiten asumir que este proceso ocurrió una sola vez (Lan et al., 2009). Además, el tratamiento del genoma de *S. Typhimurium* DT104 con el enzima de restricción *Xba*I genera un patrón de PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) característico, denominado Xtm 1 (Threlfall et al., 2005). Tanto en este caso como en otros, una vez se adquieren los genes de resistencia, su mantenimiento parece estar muy relacionado con el uso de antibióticos en la industria ganadera (Branchu et al., 2018; Threlfall, 2000).

#### 1.4.2 Isla Genómica de *Salmonella* 1 (SGI1)

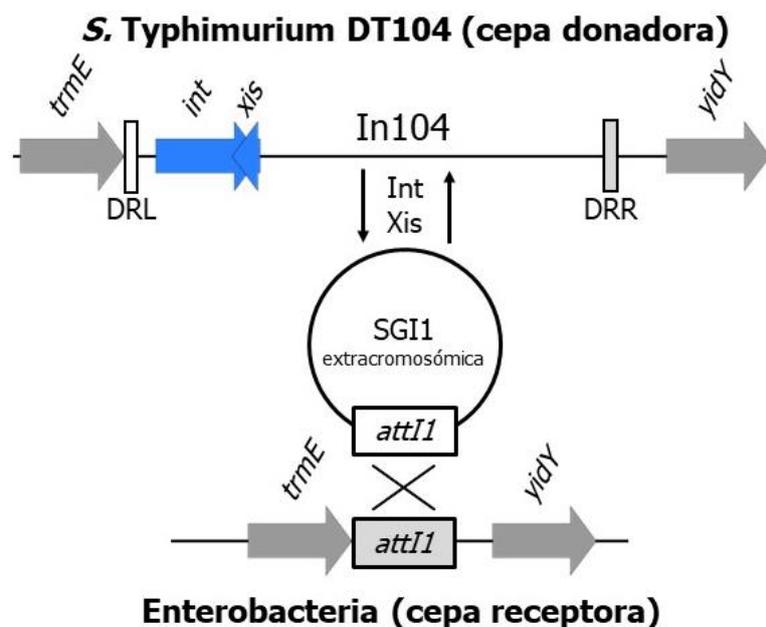
En 1994 se demostró que la codificación de la resistencia en el clon DT104 es cromosómica (Threlfall, 2000), encontrándose los genes en la isla genómica de resistencia denominada SGI1. Esta isla es un ICE de unas 43 kb que se encuentra insertado en el extremo 3' del gen *trmE* y en la proximidad del gen *gidY* (Levings et al., 2005; Mulvey et al., 2006). La SGI1 está flanqueada por repeticiones directas de 18 bp, denominadas DRR y DRL (Doublet et al., 2005). En la isla encontramos unas 28 Pautas Abiertas de Lectura (ORFs; del inglés *Open Reading Frames*), muchas de ellas de función aún desconocida (de Curraize et al., 2020).

Desde el año 2000, se sabe que los genes que confieren el fenotipo de resistencia ACSSuT típico de este clon se concentran en una zona específica, de unas 15 kb de tamaño, insertada dentro de la SGI1 cerca del gen de la resolvasa (*resG*) (de Curraize et al., 2020). Esta región de multirresistencia a drogas (MDR; del inglés *Multi-Drug Resistance*) es un integrón complejo de clase 1 que ha sido nombrado In104 y que en realidad se trata de dos integrones, localizado uno en cada extremo (Levings et al., 2005). Esto significa que existen dos sitios *attI1*, en uno de los cuales se insertó el gen *aadA2* (que confiere resistencia frente a antibióticos de la familia de los



aminoglicósidos), y en el otro el gen *bla<sub>PSE-1</sub>* (frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos). Además, en la región 3'CS se encuentran ya mencionados *qacEA1* y *sul1* (Levings et al., 2005; Mulvey et al., 2006). Por otro lado, en la región central situada entre las dos copias del integrón encontramos los genes de resistencia *tet(G)* (frente a tetraciclinas) y *floR* (frente a cloranfenicol y florfenicol) (Levings et al., 2005). Los mecanismos de resistencia codificados por dichos genes se comentarán en el apartado de resultados y discusión.

Junto a dichos genes de resistencia, en la SGI1 encontramos además numerosos elementos génicos relacionados con la movilidad del ADN y con la transmisión horizontal de la isla. El mecanismo se representa en la Figura 3. Primeramente, una integrasa y una excisionasa, codificadas por los genes *int* y *xis* respectivamente, permiten la escisión de la isla por recombinación entre los sitios DRR y DRL y la formación de una molécula circular extracromosómica (Doublet et al., 2005). A continuación, la movilización de esa molécula circular de una bacteria a otra requiere la acción de proteínas no codificadas por la isla, sino por plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncA e IncC, que pueden estar presentes en la misma célula (de Curraize et al., 2020). La posterior integración de la SGI1 en su forma circular en el cromosoma de la cepa receptora ocurre de nuevo por recombinación específica entre los sitios *att*, catalizada igualmente por Int y Xis. (Doublet et al., 2005). Gracias a este sistema, la SGI1 es capaz de transferirse desde una cepa donadora de *S. Typhimurium* DT104 no sólo a otras cepas de *Salmonella* pertenecientes al mismo o a distinto serotipo, sino también a otras enterobacterias, diseminando así la resistencia (de Curraize et al., 2020).



**Figura 3. Mecanismos de movilización de la SGI1 entre una cepa DT104 donadora y una enterobacteria receptora que presenta un sitio *attI1* en su cromosoma.**

Las repeticiones que flanquean la SGI1, DRL y DRR, se corresponden con los sitios de recombinación *attI1* presentes en la isla y en el cromosoma receptor respectivamente. (Basado en Kis *et al.*, 2012).



El origen de la SGI1 es difícil de conocer con exactitud. Sin embargo, todo apunta a que a que primero una cepa receptora habría adquirido una isla primitiva carente del integrón In104 mediante transferencia horizontal (Cloeckaert & Schwarz, 2001; Levings et al., 2005; Mulvey et al., 2006). Posteriormente, el integrón se habría incorporado a la isla por transposición (de Curraize et al., 2020). Ahora bien, el origen individual de cada uno de los elementos de resistencia para formar In104 es difícil de rastrear: aunque los genes *aadA2*, *bla<sub>PSE-1</sub>* y *sul1* son comunes en las enterobacterias (Cloeckaert & Schwarz, 2001), habiéndose adquirido probablemente en diversas ocasiones, *tetG* y *floR* parecen haberse incorporado en una sola ocasión, desde una bacteria donadora cuya identidad de momento se desconoce (Leekitcharoenphon et al., 2016).

## 1.5 Objetivo del trabajo

El objetivo de este TFG se centró en el análisis fenotípico y genómico de una cepa multirresistente de *S. enterica* serotipo Typhimurium fagotipo DT104 (LSP 181/13), procedente de alimentos y cedida por el Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias. Para conseguir este objetivo general se abordaron los siguientes objetivos parciales:

1. Determinar experimentalmente el fenotipo de resistencia y el contenido plasmídico de la cepa LSP 181/13.
2. Llevar a cabo la identificación y tipificación de la cepa *in silico* y realizar un estudio bioinformático detallado de la isla de resistencia SGI1, partiendo del genoma secuenciado.
3. Analizar el contenido plasmídico de la cepa LSP 181/13 mediante diferentes herramientas bioinformáticas.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Bacterias, medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron dos cepas de *S. enterica* serotipo Typhimurium: LSP 181/13 y ATCC 14028. La cepa LSP 181/13, objeto de este trabajo, fue aislada de una muestra de alimentos (derivado cárnico), cedida por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias. Los números detrás de las siglas “LSP” indican que fue la cepa número 181 obtenida en el año 2013. La ATCC (*American Type Culture Collection*) 14028 es una cepa silvestre que es sensible a los antibióticos conocidos y se emplea comúnmente como referencia. También se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* portadoras de plásmidos de diferente tamaño (ver apartado 3.3.): *E. coli* V517 (150; 65; 37 y 7 kb) y *E. coli* 39R861 (54; 7,3; 5,6; 5,1; 3,9; 3; 2,7 y 2.1 kb). Las cepas



bacterianas fueron sembradas en tres medios de cultivo diferentes, cuya composición se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1. Medios de cultivo empleados**

Nombre	Composición (Casa comercial)	Uso
Caldo Luria-Bertani (LB)	10 g/L de triptona 10 g/L de NaCl 5 g/L de extracto de levadura	Medio permisivo para el crecimiento de gran variedad de organismos
Agar Müller-Hinton (MH)	300 g/L de caldo de carne 17,5 g/L de hidrolizado de caseína 1,5 g/L de almidón 17 g/L de agar	Medio usado para determinar la sensibilidad a antibióticos de patógenos de interés
Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB)	10 g/L de peptona 10 g/L de lactosa 2 g/L de fosfato dipotásico 0,4 g/L de eosina Y 0,065 g/L de azul de metileno 15 g/L de agar	Medio selectivo para bacilos Gram-negativos y usado en el aislamiento de enterobacterias y coliformes

En el caso del agar MH y EMB, se usaron preparados comerciales (OXOID, Madrid, España), de los cuales se diluyeron respectivamente 3,8 g y 3,75 g en 100 mL de agua destilada. Una vez preparados los medios, fueron esterilizados por calor al llevarlos a ebullición. Tras ello, los preparados de EMB y MH se dejaron solidificar en placa, mientras que el medio LB fue distribuido en diversos recipientes y se mantuvo líquido. Las cepas sembradas en los medios MH y EMB fueron incubadas en la estufa a 37 °C, mientras que los cultivos de caldo LB fueron incubados en agitación a la misma temperatura. Las cepas se mantienen congeladas a -70 °C para su conservación. Para ello se añaden 400 µL de glicerol al 30% a 600 µL de un cultivo de bacterias crecidas en medio LB líquido. Para su posterior utilización primero se siembra la cepa en una placa de medio selectivo EMB en estrías para obtener colonias aisladas. Las bacterias procedentes de una colonia aislada se siembran en medio LB y se dejan crecer a 37 °C durante una noche utilizándolas directamente, o en su defecto son conservadas a 4 °C.

## 2.2 Antibiograma

Se realizó un antibiograma para evaluar la sensibilidad o resistencia a 20 antibióticos de la cepa LSP 181/13, usando a ATCC 14028 como control sensible. Se utilizaron para ello discos impregnados de los siguientes compuestos con la cantidad indicada en microgramos (OXOID): amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30), ampicilina (AMP; 10), cefepime (FEP; 30), cefotaxima (CTX; 30), ceftioxitina (FOX; 30), ertapenem (ETP; 10), amikacina (AK; 30), estreptomina (S; 10), gentamicina (CN; 10), kanamicina (K; 30), tobramicina (TOB; 10), ácido nalidíxico (NA; 30),



ciprofloxacina (CIP; 5), azitromicina (AZM; 15), cloranfenicol (C; 30), colistina (CL; 10), nitrofurantoína (F; 300), sulfonamidas (SUL; 300), tetraciclina (T; 30) y trimetoprim (W; 5). Las cepas se sembraron por estría en placas de agar EMB. Las bacterias procedentes de una colonia aislada en el agar EMB se inocularon en caldo LB, dejándolas crecer una noche más, según se comentó anteriormente. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron 100 veces en medio LB y se tomaron 30  $\mu$ L para sembrar por sávana las placas de agar MH. Se inocularon tres placas de agar MH por cada cepa de *S. Typhimurium* para la realización de antibiograma. Se depositaron siete discos en dos de las placas, y seis en la restante. En torno a los discos, en caso de que hubiera resistencia, no se esperaba encontrar halo de inhibición de ningún tipo. En caso de que la cepa fuera sensible, o resistente en grado variable, el diámetro del halo encontrado fue interpretado de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) en su versión de 2019.

### 2.3 Extracción de plásmidos

Para la extracción de plásmidos se empleó el método descrito en Kado & Liu (1987). A partir de colonias aisladas del medio EMB, tanto de LSP 181/13 como de las cepas control *E. coli* V517 y *E. coli* 39R861, se inocularon 2 mL de caldo LB, y se incubaron durante 24 horas. A continuación se tomó 1 mL del cultivo de cada cepa y se centrifugó a 14.000 rpm durante 6 minutos. Se descartó el sobrenadante, y se resuspendieron los sedimentos en 20  $\mu$ L de solución KD-I mediante agitación en el vórtex. Entonces se añadieron 100  $\mu$ L de KD-II y se calentó en un baño a 55 °C durante 30 minutos. En la Tabla 2 se detalla la composición de las soluciones KD-I y KD-II. Se adicionaron entonces 50  $\mu$ L de fenol ácido y cloroformo-isoaminoalcohol (48:2 mL), en proporción 1:1, agitando para mezclar bien los compuestos. A continuación, se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 rpm. Como resultado de este paso, se generaron dos fases diferenciadas, tomando únicamente la superior, que es donde se encuentran los plásmidos.

**Tabla 2. Composición detallada de las soluciones empleadas en la extracción de plásmidos.**

KD-I	KD-II
5 mL Tris-HCl (1M; pH 8) 200 $\mu$ L EDTA (0,5 M ; pH 8) Agua destilada hasta 100 mL	0,60 g Tris 3 g SDS 4,1 mL NaOH (2N) Agua destilada hasta 100 mL

Para la visualización de los plásmidos extraídos por el procedimiento anterior, se tomaron 100  $\mu$ L de la fase acuosa y se les añadió tampón de carga en proporción 1:10. Las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa preparado previamente usando 0,6 g de agarosa y 100 mL



de tampón TAE (de composición 40 mM Tris-Acetato y 2 mM EDTA). Tras el procedimiento de electroforesis, de 3 horas de duración, el gel fue tratado con bromuro de etidio (200  $\mu$ L de una disolución a una concentración de 25  $\mu$ g/mL en 500 ml de agua) en agitación con el fin de teñirlo. Una vez completado el teñido, el gel se dejó en agitación en agua destilada para eliminar los restos del compuesto. Una vez descartado el líquido, se observó el gel en un transiluminador y se fotografió con Gel Doc (Bio-Rad, Madrid, España).

## 2.4 Secuenciación y ensamblaje del genoma

El genoma de la cepa LSP 181/13 fue secuenciado por la compañía Eurofins (Alemania) en el marco de un Proyecto de Investigación del grupo donde se realizó el TFG. Se utilizó para ello una plataforma Illumina 1.9, produciendo lecturas pareadas de 150 nt, a partir de los dos extremos de fragmentos de 500 bp. La empresa envió las lecturas limpias correspondientes a las cadenas directa y reversa en formato FastQ.

La calidad de las lecturas fue evaluada usando el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). FastQC permite el análisis de archivos en formato FastQ, generando un informe donde se presentan una serie de parámetros, como el índice de calidad “*Q score*” que indica la probabilidad de que cada una de las bases haya sido incorrectamente identificada. El ensamblaje de las lecturas se llevó a cabo con el ensamblador genómico SPAdes (*Saint Petersburg Genome Assembler*) en su versión 3.14.0 (<https://cab.spbu.ru/software/spades/>), generando un archivo en formato Fasta. Para el ensamblaje, las secuencias se descomponen en otras de menor tamaño denominadas *K-mers*, siendo la longitud óptima de 127 nucleótidos para este genoma. El programa identifica lecturas solapantes en los *K-mers* y genera fragmentos de mayor tamaño denominados “*contigs*”. La calidad del ensamblaje fue evaluada usando QUILT (*Quality Assessment Tool*), en su versión 4.6.3 (<http://quilt.sourceforge.net/>). Los parámetros tomados para la evaluación de la calidad fueron N50, que indica la longitud (nucleótidos) del *contig* más pequeño que junto los *contigs* de mayor tamaño abarcan la mitad de todo el genoma, y L50, que es el número de *contigs* que tienen una longitud idéntica o superior a N50.

## 2.5 Análisis bioinformático

El análisis del genoma de la cepa LSP 181/13 se llevó a cabo mediante diversas herramientas bioinformáticas del Centro de Epidemiología Genómica (CGE) disponibles *online* (<https://www.genomicepidemiology.org/>). Todas las seleccionadas para este TFG se basan en la utilización de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que compara secuencias de *K-mers*, genes u otras regiones del genoma problema con las secuencias presentes en bases de datos,



encontrando las que presentan mayor cobertura e identidad. Las herramientas utilizadas permitieron la identificación y tipificación de la bacteria, la búsqueda de genes de resistencia y la detección de plásmidos.

Para la identificación se emplearon dos herramientas: SpeciesFinder y KmerFinder. La primera se basa en la comparación de la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S del genoma “problema” y de los genomas de referencia almacenados en la base de datos, siendo esta una metodología clásica en taxonomía bacteriana. Por otro lado, KmerFinder logra la identificación de la especie en función del número de *K-mers* que tienen en común el genoma de la bacteria a identificar y los genomas de referencia en la base de datos dada. Para la tipificación también se utilizaron dos herramientas: SeqSero y MLST (*Multilocus Sequence Typing*), que aporta la secuencia tipo (ST). La herramienta SeqSero permitió establecer el serotipo de la cepa en función del grupo de genes *rfb* (que determinan el antígeno O principal), y de los genes *fliC* y *fliB* (que determinan los antígenos H). Para determinar la ST, MLST compara la secuencia de fragmentos internos de 7 genes conservados, pertenecientes al genoma *core* de *S. enterica*. Esto permite identificar el alelo correspondiente a cada gen y a cada combinación de alelos se le asigna una ST.

La búsqueda *in silico* de genes de resistencia se llevó a cabo mediante la herramienta ResFinder, que por un lado permite la identificación de genes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal, y por otro la identificación de mutaciones puntuales implicadas en resistencia.

Finalmente, el análisis plasmídico *in silico* se llevó a cabo con PlasmidFinder. Esta herramienta se basa en la comparación del genoma secuenciado con los replicones almacenados en la base de datos, pertenecientes a los 18 grupos de incompatibilidad descritos en las enterobacterias. Por otra parte, para cinco de esos grupos de incompatibilidad (IncF, IncI1, IncN, IncHI2, y IncHI1) se puede determinar también el perfil MLST gracias a la herramienta pMLST. Esta se basa en la secuencia de alelos de genes pertenecientes al genoma conservado de los plásmidos de dichos grupos.

## **2.6 Reconstrucción de la región de resistencia de la isla genómica SGI1 y del plásmido pSLT**

La reconstrucción y anotación de la región de resistencia de SGI1 se llevó a cabo con las herramientas de Clone Manager en su versión 7. Para ello se utilizó “*Scan for similarity*” que permite buscar regiones de similitud entre una secuencia de referencia y el genoma de interés. Como referencia se utilizó la secuencia de la SGI1 de la cepa de *Salmonella* Typhimurium DT104



96-5227 disponible en GeneBank (número de acceso AF261825.2). Una vez identificados los *contigs* que tenían regiones solapantes, estos se ligaron *in silico* para obtener un fragmento continuo, utilizando la herramienta “*Ligate*”. Un procedimiento idéntico se llevó a cabo para reconstruir el plásmido pSLT de la cepa LSP 181/13, usando como referencia el plásmido pSLT de la cepa *S. Typhimurium* A-cip, secuenciado previamente (GeneBank: NZ CP074095).

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Determinación del fenotipo de resistencia

Para dilucidar la resistencia a antibióticos de la cepa LSP 181/13, esta se sembró en el medio MH, colocando a continuación discos embebidos en los compuestos antimicrobianos sobre la superficie del medio inoculado. Una vez crecidas las bacterias, se tomaron fotografías de las placas (Figura 4). Es apreciable la ausencia de halo de inhibición en algunos casos, siendo entonces la cepa resistente al compuesto y en otros se formaron halos de inhibición de diferentes tamaños.



**Figura 4. Antibiograma correspondiente a la cepa LSP 181/13.**  
Los antibióticos para los que se encontró resistencia se indican con una flecha.

En los casos que procedió se miró el diámetro de inhibición alrededor del disco (ver Anexo 6.1) y los datos se interpretaron de acuerdo con las indicaciones dadas en *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* (CLSI, 2019), tal y como se describió en la sección de Materiales y Métodos (Tabla 3). Según se muestra en la Tabla 3 la cepa fue resistente a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, estreptomicina, cloranfenicol y sulfonamidas, que pertenecen a cuatro clases distintas de antibióticos. Llama la atención que la cepa LSP 181/13, a pesar de pertenecer al fagotipo DT104, es sensible a tetraciclina. Este resultado se discutirá posteriormente.



**Tabla 3. Fenotipo de resistencia de la cepa LSP 181/13.**

<b>Antibiótico</b>	<b>Clase</b>
Ampicilina	$\beta$ -Lactámicos
Amoxicilina-ácido clavulánico	$\beta$ -Lactámicos
Estreptomina	Aminoglicósidos
Cloranfenicol	Fenicoles
Sulfonamidas	Sulfonamidas

Se indican los compuestos para los que se halló resistencia en base a los criterios del CLSI y la clase a que pertenecen.

Los mecanismos de resistencia frente a estos grupos de antibióticos son diversos. **Los compuestos  $\beta$ -lactámicos** comparten en su estructura el anillo  $\beta$ -lactámico que da nombre al grupo, y su potencial quimioterapéutico deriva de su capacidad para inhibir irreversiblemente el enzima transpeptidasa durante la síntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular bacteriana (Murray et al., 2013). Aunque existen varios mecanismos de resistencia, la hidrólisis del anillo por parte de enzimas  $\beta$ -lactamasas es la vía más común de inactivación de estos antibióticos (Munita & Arias, 2016).

**Los aminoglicósidos** inhiben la síntesis proteica de forma irreversible al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Murray et al., 2013). La resistencia frente a estos se puede conseguir de diversas formas, pero la modificación enzimática del antibiótico (por adenilación, acetilación o fosforilación) representa la principal fuente de resistencia (Munita & Arias, 2016).

La acción de **los fenicoles** se asocia al bloqueo de la síntesis proteica mediante su unión a la subunidad 50S del ribosoma (Murray et al., 2013). La sensibilidad reducida a los mismos se basa principalmente en la inactivación del antibiótico por acetilación, pero los sistemas de bombeo hacia el exterior también son de gran relevancia en *Salmonella* (Mąka & Popowska, 2016).

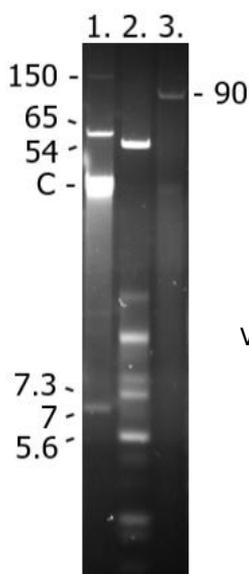
Las sulfonamidas son análogos estructurales del ácido *p*-aminobenzoico, sustrato del enzima dihidropteroato sintasa e intermediario en la síntesis del folato, esencial a su vez para la síntesis de ácidos nucleicos (Mąka & Popowska, 2016; Murray et al., 2013). La resistencia a estos compuestos se basa en formas alternativas del enzima que no se inhiben en su presencia (Mąka & Popowska, 2016).



Finalmente, dada la importancia de la resistencia a tetraciclinas en las cepas de fagotipo DT104, mencionar que la acción de estos antibióticos se basa en inhibir la unión del ARNt a la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo así la síntesis proteica (Murray et al., 2013). Los mecanismos que confieren resistencia a tetraciclinas se basan bien en la protección del ribosoma, o bien en la producción de sistemas de bombeo que expulsan los compuestos fuera de la célula, siendo este último el más común (Małka & Popowska, 2016).

### 3.2 Identificación experimental de plásmidos

Para conocer si la cepa LSP 181/13 es portadora de plásmidos, se realizó una extracción de ADN plasmídico siguiendo el procedimiento de Kado & Liu (1987), tal y como se describió en materiales y métodos. Para analizar el ADN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Según puede verse en la Figura 5, la calle correspondiente a la cepa LSP 181/13 presenta una única banda y si comparamos su posición con la de las bandas correspondientes a las cepas control podemos concluir que LSP 181/13 contiene un único plásmido, de aproximadamente 90 kb. Por su tamaño, podría tratarse de pSLT, el plásmido de virulencia de *S. Typhimurium*, lo cual se analizará posteriormente.



**Figura 5. Perfil plasmídico de la cepa LSP 181/13**  
Se muestra la fotografía del gel de agarosa una vez teñido con bromuro de etidio. Las calles 1 y 2 corresponden a las cepas control V517 y 39R861 de *E. coli*, y la calle 3 a LSP 181/13, que presenta una única banda de unas 90 kb

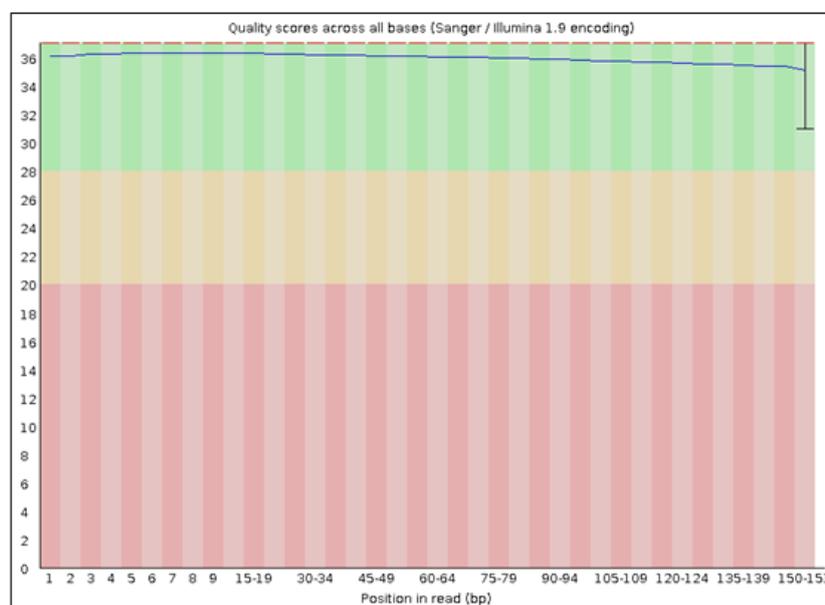
### 3.3 Análisis bioinformático del genoma de la cepa LSP 181/13

#### 3.3.1 Análisis de la calidad de las secuencias y ensamblaje del genoma

La secuenciación del ADN de la cepa LSP 181/13 fue realizada, como ya se ha mencionado, mediante la tecnología Illumina. El análisis de la calidad de las lecturas se llevó a cabo mediante FastQC. Este identificó un total 25.758.514 lecturas de una longitud de 151 bp, dato que permite calcular la cobertura, esto es, el número de lecturas únicas que incluyen un nucleótido dado en la secuencia ensamblada. Considerando que el genoma de *Salmonella enterica* tiene un tamaño



de unos 5000 Mbp, usando la fórmula  $C = N \times (L/G)$ , siendo N el número de lecturas, L la longitud de estas y G el tamaño del genoma completo, se obtiene una cobertura de 780 veces, la cual es muy alta. La herramienta FastQC también permite conocer la calidad de las lecturas a través de un gráfico en el que se representa el valor de Q, es decir la probabilidad de error al asignar una base, a lo largo de la secuencia de 151 nt, como el que aparece representado en la Figura 6. El valor de Q para cada posición se obtiene mediante la fórmula  $Q = -10 \log_{10} P$ , donde P es la probabilidad de haber asignado incorrectamente una base. FastQC produce dos gráficas, una para las lecturas directas y otra para las inversas. Aquí solo se muestra la correspondiente a las directas por simplicidad y debido a que no existe gran diferencia en cuanto a calidad siendo el valor de Q superior a 34 en ambos casos.



**Figura 6. Calidad de las lecturas por base (lecturas directas).**

El valor de Q para cada base obtenido mediante la herramienta FastQC fue superior a 34 (línea azul). La zona verde de la gráfica corresponde a calidad alta.

Una vez demostrada la elevada calidad de las secuencias obtenidas se procedió a ensamblar el genoma utilizando la herramienta SPAdes y la calidad del ensamblaje se estudió con QUAST. Los principales parámetros resultantes del análisis se recogen en la Tabla 4. El tamaño del genoma obtenido para la cepa LSP 181/13 fue de 4.974 Mpb, lo cual está de acuerdo con lo esperado para la especie estudiada. El número total de *contigs* fue de 133, con 26 de ellos de un tamaño mayor de 50 Kb. El valor obtenido para N50 (la longitud del *contig* más pequeño que junto los *contigs* de mayor tamaño abarcan la mitad de todo el genoma) fue de 204,65 Kbp y el de L50 (el número de *contigs* que tienen una longitud idéntica o superior a N50) fue de 7, lo cual indica una buena calidad. Otros parámetros de interés se recogen en el Anexo 6.2.



**Tabla 4. Principales parámetros del análisis de la calidad del ensamblaje con QUAST.**

Parámetros del ensamblaje	Cepa LSP 181/13
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 0$ bp)	133
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 50000$ bp)	26
Longitud total ( $\geq 0$ bp)	4.992.518
Longitud total ( $\geq 50000$ bp)	4.630.964
Longitud total	4.974.511
N50	204.652
L50	7

### 3.3.2 Identificación de la especie y tipificación bacteriana

La identificación *in silico* de la especie a que pertenecía la cepa LSP 181/13 se llevó a cabo mediante las herramientas SpeciesFinder y KmerFinder, que arrojaron resultados distintos. Por un lado, la primera identificó el genoma como perteneciente a *Citrobacter freundii*, en contra de la información previamente suministrada por el LSP para esa cepa. Por otro lado, KmerFinder encontró que el genoma de la bacteria pertenecía a *S. enterica* serotipo Typhimurium, con un porcentaje cubierto por *K-mers* del 97,36%. Estos resultados concuerdan con observaciones previas sobre la baja discriminación de SpeciesFinder, basado en la comparación de las secuencias de los ARNr 16S, en comparación con herramientas basadas en el alineamiento de *K-mers*, con lo cual en el futuro debería limitarse el uso a estas últimas (Clausen et al., 2018).

La utilización de la herramienta SeqSero, además de confirmar los resultados de KmerFinder clasificando de nuevo el aislamiento como *S. Typhimurium*, proporcionó el perfil antigénico 4:i:1,2 (Tabla 5), donde el primer dígito se corresponde con el antígeno O principal, la letra “i” con el antígeno H1 y los dos siguientes con los antígenos H2. Aunque la fórmula antigénica completa de *S. Typhimurium* es 1,[4],5,12:i:1,2, la herramienta no detecta todos los antígeno O. Según se comentó en la introducción, las cepas de *S. Typhimurium* pueden ser bifásicas o monofásicas y el hecho de que existan antígenos H2 (1,2) demuestra que la cepa LSP 181/13 es bifásica.



**Tabla 5. Determinación del serotipo de la cepa LSP 181/13 con la herramienta SeqSero.**

Perfil antigénico	4:i:1,2
Antígeno O	4
Antígeno H1	i
Antígenos H2	1,2

Por otro lado, la herramienta MLST identificó los alelos de los 7 genes que se analizan para determinar la secuencia tipo de *S. enterica*. Según se puede ver en la Tabla 6, la combinación de alelos encontrados se ajusta a la correspondiente a la ST19. Este resultado fue el esperado para una cepa de *S. Typhimurium* DT104 (Lan et al., 2009).

**Tabla 6. Determinación de la secuencia tipo de la cepa LSP 181/13 en base al análisis con la herramienta MLST.**

Locus	Identidad	Cobertura	Alelo
<i>aroC</i>	100	100	<i>aroC</i> 10
<i>dnaN</i>	100	100	<i>dnaN</i> 7
<i>hemD</i>	100	100	<i>hemD</i> 12
<i>hisD</i>	100	100	<i>hisD</i> 9
<i>purE</i>	100	100	<i>purE</i> 5
<i>sucA</i>	100	100	<i>sucA</i> 9
<i>thrA</i>	100	100	<i>thrA</i> 2

### 3.3.3 Identificación de genes de resistencia: análisis de la isla genómica SGI1

El análisis *in silico* de los genes que confieren resistencia frente a antibióticos se llevó a cabo mediante ResFinder que identifica tanto genes de resistencia adquiridos como mutaciones puntuales en genes cromosómicos. Como se ve en la Tabla 7, esta herramienta localizó siete coincidencias en el genoma de la cepa LSP 181/13, que podrían ser responsables del fenotipo de resistencia encontrado experimentalmente. Los genes identificados fueron *bla<sub>PSE-1</sub>* (*bla<sub>CARB-2</sub>*), que confiere resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos como la ampicilina o la amoxicilina, *aadA2*, frente a estreptomicina, *floR*, frente a cloranfenicol, *sul1*, frente a sulfonamidas, *tet(G)*, frente a tetraciclinas y *qac $\Delta$ 1*, frente a desinfectantes y compuestos de amonio cuaternarios (Mařka &



Popowska, 2016; Munita & Arias, 2016; Partridge et al., 2018). ResFinder encontró también el gen *aac(6′)-laa*. Sin embargo, este gen no es funcional en *Salmonella*, de ahí que no se obtuviera un fenotipo de resistencia para kanamicina y otros aminoglicósidos, que sí confiere a otras bacterias. Es importante resaltar también que la resistencia frente a amoxicilina-ácido clavulánico se debe probablemente a un aumento en la expresión del gen *bla<sub>PSE-1</sub>*, aunque este hecho no se demostró experimentalmente. Finalmente llama la atención la baja cobertura en el caso de los genes *sul1* y *qacEΔ1*, del 64,13% y 84,68% respectivamente, lo cual se comentará posteriormente.

**Tabla 7. Identificación de genes de resistencia presentes en la cepa LSP 181/13 mediante ResFinder y su implicación en resistencia.**

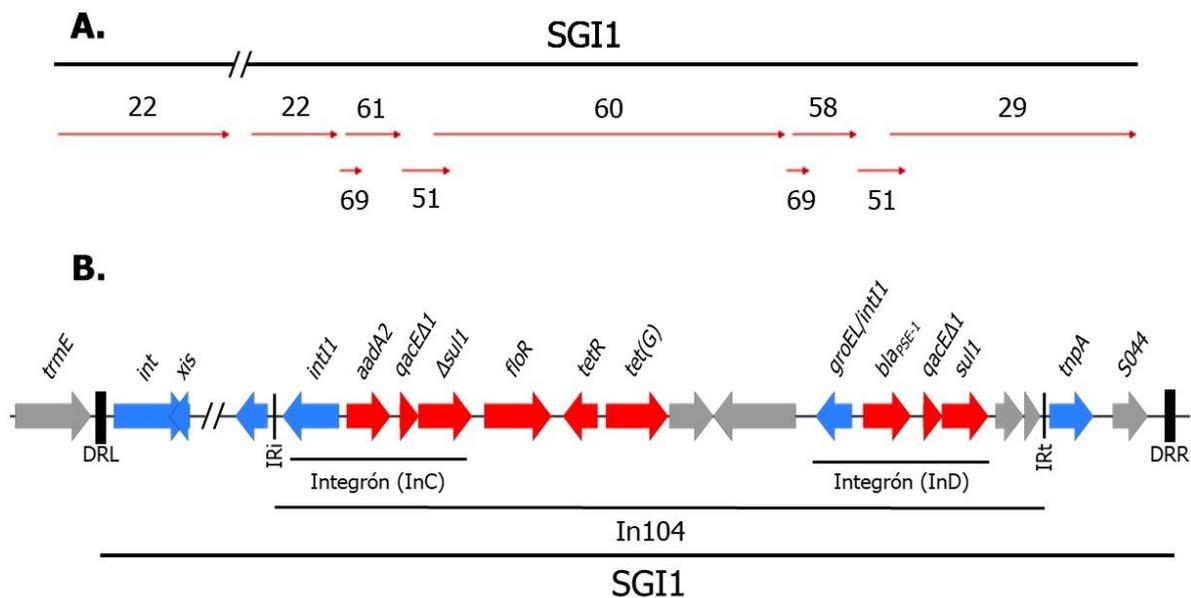
Gen	Identidad	Cobertura	Grupo de antimicrobianos	Mecanismo de resistencia
<i>bla<sub>PSE-1</sub></i>	100	100	β-Lactámicos (ampicilina y amoxicilina)	Hidrólisis del anillo β-lactámico
<i>aadA2b</i>	99.8718	100	Aminoglicósidos (estreptomicina)	Acción adenilil-transferasa
<i>aac(6′)-laa</i>	100	100	Aminoglicósidos (kanamicina)	Acción acetil-transferasa
<i>floR</i>	100	100	Fenicoles	Bombeo del antibiótico al exterior
<i>sul1</i>	99.8201	64.1292	Sulfonamidas	Formas alternativas del enzima dihidropteroato sintasa
<i>tet(G)</i>	100	100	Tetraciclinas	Bombeo del antibiótico al exterior
<i>qacE</i>	100	84.6847	Desinfectantes	Bombeo del desinfectante al exterior

La cepa LSP 181/13 había sido identificada y tipificada por el LSP como *S. Typhimurium* DT104 y una de las características de los clones de este fagotipo es la presencia de la isla genómica SGI1, que contiene genes de resistencia. Por ello, mediante la herramienta Clone Manager se analizó el genoma de la cepa LSP 181/13 utilizando como referencia la secuencia de la SGI1 de la cepa *S. Typhimurium* DT104 96-5227 (GeneBank: AF261825.2). Los *contigs* que contenían regiones de elevada similitud fueron primero ensamblados según se muestra en la Figura 7A. Posteriormente, se anotaron los genes de resistencia y otros elementos relevantes. La comparación de las secuencias demostró que ambas SGI1 presentan una identidad superior al 99,9%. Al igual que lo descrito previamente para la SGI1 (Clockaert & Schwarz, 2001; Levings



et al., 2005; Mulvey et al., 2006), la isla de LSP 181/13 se ha integrado en el extremo 3' del gen *trmE*, manteniendo las secuencias repetidas directas relacionadas con su movilidad y los genes de resistencia que confieren el fenotipo pentarresistente agrupados en In104 y en la región central de multiresistencia.

En la figura 7B se muestran estos elementos relevantes. El análisis reveló que el gen *qacE* está presente en una variante alélica, *qacEΔ1*, de funcionalidad reducida generada por inserción de una secuencia en el extremo 3' del gen (Paulsen et al., 1993). Este hecho explica la baja cobertura encontrada por ResFinder. De manera similar, el gen *sul1* de unos de los integrados está truncado (en su forma  $\Delta sul1$ ) por ADN exógeno, de forma que solo se mantiene el 66,4% del gen original. El resto de genes de resistencia se encuentran ordenados tal y como se comentó en el apartado 1.5., con *aadA2* en uno de los integrones de clase 1 (denominado InC) y *bla<sub>PSE-1</sub>* en el otro (InD), mientras que los genes *floR*, y *tet(G)* (junto con su regulador *tetR*) están situados entre ambos integrones (Mulvey et al., 2006).



**Figura 7. Análisis de la isla genómica SGI1 de la cepa LSP 181/13 mediante Clone Manager.**

A: Esquema del ensamblaje de los de los *contigs* que mostraron una alta similitud con la secuencia de la SGI1 utilizada como control. Los números corresponden a los de los *contigs* identificados.

B: Elementos génicos de interés alojados en la SGI1 de la cepa LSP 181/13 de *S. Typhimurium*. Rojo: genes de resistencia; azul: genes implicados en movilidad; gris: otros genes presentes en SGI1.

Es importante comentar que aunque la SGI1 presente en la cepa LSP 181/13 se ajusta a la descrita inicialmente, se han encontrado numerosas variantes que confieren fenotipos distintos al pentarresistente. Así, a través de recombinación entre las secuencias repetidas homólogas de los integrones de In104, tuvo lugar la pérdida de genes, dando lugar a variantes que contienen un único integrón de clase 1, como por ejemplo la variante SGI1-B, que confiere un fenotipo de resistencia ASu (*bla<sub>PSE-1</sub>* y *sul1*), o la SGI1-C, que confiere fenotipo SSu (*sul1* y *aadA2b*) (Mulvey et al., 2006). Sin embargo, otras variantes han incorporado por recombinación



nuevos casetes en la región variable de los integrones, como el gen *drfA1* (SGI1-I y SGI1-J) que confiere resistencia a trimetoprim. Esa diversificación a nivel genómico ocurría al mismo tiempo que la cepa pentarresistente original se diseminaba geográficamente, observándose en 1992 linajes con resistencia adicional a ciprofloxacina o trimetoprim (fenotipos ACSSuTCp y ACSSuTTm) y posteriormente, en 1996, a ambos antibióticos (ACSSuTTmCp) (Threlfall, 2000). Aunque la incorporación de nuevos genes a la isla es de gran importancia, también hay que recordar que una buena parte de la diversidad genética se asocia a su vez a genes de resistencia ubicados fuera de la SGI1, tanto en el cromosoma como en plásmidos. Por ejemplo, podemos mencionar la resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, asociada a mutaciones puntuales en el gen cromosómico *gyrA* (Cloeckaert & Schwarz, 2001; Threlfall, 2000; Threlfall et al., 2005), y la resistencia a trimetoprim codificada por el gen *dhfr1b*, alojado en un plásmido (Threlfall et al., 2005) responsables de la aparición de linajes con fenotipos ACSSuTCp, ACSSuTTm y ACSSuTTmCp (Threlfall, 2000). De manera similar, la cepa LSP 181/13 analizada en este trabajo podría estar evolucionando de forma que o bien haya perdido el gen *tet(G)* o su regulador *tetR*, o bien alguno de estos genes haya sido inactivado por mutación. Esto debería haber ocurrido entre el momento en que se secuenció el genoma de LSP 181/13 (a principios de 2021) y el de realización del presente trabajo, lo cual explicaría la sensibilidad de la cepa a la tetraciclina. La pérdida de *tet(G)* y/o *tetR* podrá ser comprobada en un futuro mediante la técnica de amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la existencia de mutaciones inactivantes mediante amplificación seguida de secuenciación Sanger.

La SGI1 presente en la cepa LSP 181/13 contiene todos los elementos necesarios para su movilización por plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncC o IncA, como *int*, *xis* y *res*, así como las secuencias DRL y DRR. Por ello, su movilización puede dar lugar a la diseminación de los genes de resistencia alojados en la SGI1, tanto en *Salmonella* como en otras enterobacterias, con el importante problema de salud pública que ello conlleva.

### 3.3.4 Identificación y caracterización plasmídica

La caracterización del contenido plasmídico *in silico* se realizó mediante PlasmidFinder, que identifica el grupo de incompatibilidad del plásmido en base a genes como *repA*, que codifica una proteína esencial para que pueda iniciarse la replicación del plásmido. Utilizando la configuración específica para enterobacterias, PlasmidFinder localizó dos replicones del grupo de incompatibilidad IncF, IncFIB (S) e IncFII (S), en ambos casos con un 100% de identidad con las secuencias de referencia utilizadas por la herramienta (Tabla 8). Estos replicones son



característicos de los plásmidos de virulencia específicos de determinados serotipos de *Salmonella*, como *S. Typhimurium*.

**Tabla 8. Identificación plasmídica en base a grupos de incompatibilidad mediante PlasmidFinder.**

Plásmido	Identidad	Longitud	Número GeneBank
IncFIB (S)	100	643/643	FN432031
IncFII (S)	100	262/262	CP000858

También se utilizó la herramienta pMLST, que permite conocer la secuencia tipo del plásmido una vez conocido el grupo de incompatibilidad. La presencia de los alelos F1B 17 y FIIS 1 permite asignar el plásmido a la secuencia tipo S1:A-:B17 (Tabla 9).

**Tabla 9. Identificación de la secuencia tipo del plásmido mediante pMLST.**

Locus	Identidad	Cobertura	Alelo
FIB	100	100	FIB 17
FIIS	100	100	FIIS 1

Los resultados experimentales comentados anteriormente indican que la cepa LSP 181/13 contiene un único plásmido de aproximadamente 90 kb. Por otro lado, el análisis *in silico* demostró la presencia de los dos replicones característicos de pSLT, plásmido de virulencia de *Salmonella* (Partridge et al., 2018). Por ello, al igual que se había hecho para el análisis de la SGI1, se usó Clone Manager para identificar posibles *contigs* que presentasen elevada similitud con el plásmido pSLT de la cepa *S. Typhimurium* A-cip utilizado como referencia (GeneBank: NZ CP074095). El ensamblaje de los *contigs* y su análisis confirmó que LSP 181/13 presentaba un plásmido con una identidad superior al 99,5% con pSLT. El locus de virulencia *spvRABCD* se encontró en único *contig* del plásmido pSLT. Se encontraron, además, otros genes de virulencia de pSLT como el operón de fimbrias *pef*, implicado en unión de la bacteria a células diana del hospedador durante el proceso de infección (Partridge et al., 2018).

Para finalizar, es importante comentar la existencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia derivados de pSLT. Un ejemplo es pUO-StVR2, identificado en el grupo de investigación en *S. Typhimurium*. Este plásmido confiere el mismo fenotipo pentarresistente que la SGI1 cromosómica pero, con la excepción de *sul1*, asociado a genes diferentes: *bla<sub>OXA-1</sub>*, *aadA1*, *tet(B)* y *catA1* (Herrero et al., 2008). Este plásmido está evolucionando de forma que se han



identificado variantes que han perdido o adquirido genes de resistencia (Herrero-Fresno et al., 2015; datos no publicados), al igual que se comentó en el caso de SGI1.

#### 4 CONCLUSIONES

1. El análisis bioinformático del genoma de la cepa LSP 181/13 identificó los genes que justifican las resistencias a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, estreptomina, cloranfenicol y sulfonamidas, detectadas experimentalmente. Reveló, además, la presencia de un gen que confiere resistencia a tetraciclina a pesar de que la cepa no había sido resistente a este antibiótico.

2. La isla genómica SGI1 presente en la cepa LSP 181/13 comparte un 99,99% de identidad con la SGI1 de referencia, manteniendo todos los elementos génicos necesarios para su movilización. Por ello la SGI1 de LSP 181/13 puede actuar como vehículo de diseminación de los genes de resistencia que contiene.

3. Según se demostró de forma experimental, la cepa LSP 181/13 posee un único plásmido de un tamaño aproximado a 90 kb. El análisis bioinformático reveló que se trata del plásmido de virulencia pSLT específico del serotipo *S. Typhimurium*.

#### 5 BIBLIOGRAFÍA

- Blondel, C. J., Jiménez, J. C., Leiva, L. E., Álvarez, S. A., Pinto, B. I., Contreras, F., Pezoa, D., Santiviago, C. A., & Contreras, I. (2013). The Type VI Secretion System Encoded in Salmonella Pathogenicity Island 19 Is Required for Salmonella enterica Serotype Gallinarum Survival within Infected Macrophages. *Infection and Immunity*, 81(4), 1207-1220. <https://doi.org/10.1128/IAI.01165-12>
- Branchu, P., Bawn, M., & Kingsley, R. A. (2018). Genome Variation and Molecular Epidemiology of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathovariants. *Infection and Immunity*, 86(8), e00079-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00079-18>
- Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 307. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
- Cloekaert, A., & Schwarz, S. (2001). Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in Salmonella enterica typhimurium DT104. *Veterinary Research*, 32(3-4), 301-310. <https://doi.org/10.1051/vetres:2001126>
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 29<sup>th</sup> ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.



- Coburn, B., Grassl, G. A., & Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunology & Cell Biology*, 85(2), 112-118. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100007>
- de Curraize, C., Siebor, E., Neuwirth, C., & Hall, R. M. (2020). SGI0, a relative of Salmonella genomic islands SGI1 and SGI2, lacking a class 1 integron, found in *Proteus mirabilis*. *Plasmid*, 107, 102453. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102453>
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M. R., & Cloeckert, A. (2005). The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element: Integrative mobilizable SGI1 element. *Molecular Microbiology*, 55(6), 1911-1924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x>
- European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. (2021). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 308-341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>
- GBD 2017 Non-Typhoidal Salmonella Invasive Disease Collaborators. (2019). The global burden of non-typhoidal salmonella invasive disease: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet. Infectious Diseases*, 19(12), 1312-1324. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30418-9)
- Herrero, A., Rodicio, M. R., Echeita, M. A., & Mendoza, M. C. (2008). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying hybrid virulence-resistance plasmids (pUO-StVR): A new multidrug-resistant group endemic in Spain. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3-4), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.04.008>
- Herrero-Fresno, A., Rodicio, R., Montero, I., García, P., & Rodicio, M. R. (2015). Transposition and homologous recombination drive evolution of pUO-StVR2, a multidrug resistance derivative of pSLT, the virulence plasmid specific of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection, Genetics and Evolution*, 29, 99-102. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.010>
- Lan, R., Reeves, P. R., & Octavia, S. (2009). Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 9(5), 996-1005. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.011>



- Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R. S., Le Hello, S., Weill, F.-X., Baggesen, D. L., Jun, S.-R., Ussery, D. W., Lund, O., Crook, D. W., Wilson, D. J., & Aarestrup, F. M. (2016). Global Genomic Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(8), 2516-2526. <https://doi.org/10.1128/AEM.03821-15>
- Levings, R. S., Lightfoot, D., Partridge, S. R., Hall, R. M., & Djordjevic, S. P. (2005). The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *Journal of Bacteriology*, *187*(13), 4401-4409. <https://doi.org/10.1128/JB.187.13.4401-4409.2005>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Bender, K. S. (2015). *Biología de los microorganismos (14a. Ed.)*. Pearson Educación. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4760710>
- Mąka, Ł., & Popowska, M. (2016). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. Isolated from food. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *67*(4), 343-357.
- Mulvey, M. R., Boyd, D. A., Olson, A. B., Doublet, B., & Cloeckert, A. (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection*, *8*(7), 1915-1922. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.028>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología médica: 7a edición*. Elsevier.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Rådström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G., & Skurray, R. A. (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *37*(4), 761-768. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.4.761>
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M., & Daigle, F. (2010). So similar, yet so different: Uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi: Genomic comparison of *S. Typhimurium* and *S. Typhi*. *FEMS Microbiology Letters*, *305*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01904.x>
- Threlfall, E. J. (2000). Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104—A truly international multiresistant clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *46*(1), 7-10. <https://doi.org/10.1093/jac/46.1.7>



Threlfall, J., Hopkins, K. L., & Ward, L. R. (2005). Diversification in *Salmonella* Typhimurium DT104. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 980-981.  
<https://doi.org/10.3201/eid1106.050100>

## 6 ANEXOS

### 6.1 Fenotipo de resistencia de la cepa LSP 181/13

Clase	Compuesto	Halo de inhibición (cm)	Fenotipo
$\beta$ -Lactámicos	Amoxicilina-ácido clavulánico	12	Resistente
$\beta$ -Lactámicos	Ampicilina	0	Resistente
$\beta$ -Lactámicos	Cefepime	30	Sensible
$\beta$ -Lactámicos	Cefotaxima	35	Sensible
$\beta$ -Lactámicos	Cefoxitina	27	Sensible
$\beta$ -Lactámicos	Ertapenem	35	Sensible
Aminoglucósidos	Amikacina	23	Sensible
Aminoglucósidos	Estreptomicina	0	Resistente
Aminoglucósidos	Gentamicina	20	Sensible
Aminoglucósidos	Kanamicina	21	Sensible
Aminoglucósidos	Tobramicina	18	Sensible
Quinolonas	Ácido nalidíxico	28	Sensible
Quinolonas	Ciprofloxacina	40	Sensible
Macrólidos	Azitromicina	17	Sensible
Fenicoles	Cloranfenicol	0	Resistente
Polimixina	Colistina	12	Sensible
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	17	Sensible
Sulfonamidas	Sulfonamidas	0	Resistente
Tetraciclinas	Tetraciclina	18	Sensible
Inhibidores de la dihidrofolato reductasa	Trimetoprim	33	Sensible

## 6.2 Información detallada sobre el ensamblaje de las secuencias obtenida mediante la herramienta QUASt

Parámetros del ensamblaje	Cepa LSP 181/13
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 0$ bp)	133
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 1000$ bp)	56
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 5000$ bp)	38
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 10000$ bp)	35
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 25000$ bp)	32
Número de <i>contigs</i> ( $\geq 50000$ bp)	26
Longitud total ( $\geq 0$ bp)	4.992.518
Longitud total ( $\geq 1000$ bp)	4.960.527
Longitud total ( $\geq 5000$ bp)	4.927.598
Longitud total ( $\geq 10000$ bp)	4.905.752
Longitud total ( $\geq 25000$ bp)	4.845.187
Longitud total ( $\geq 50000$ bp)	4.630.964
Número de <i>contigs</i>	76
<i>Contig</i> de mayor tamaño	682.239
Longitud total	4.974.511
Contenido G+C	52,12%
N50	204.652
N75	97.101
L50	7
L75	15
Número de "N's" por cada 100 Kbp	0,00