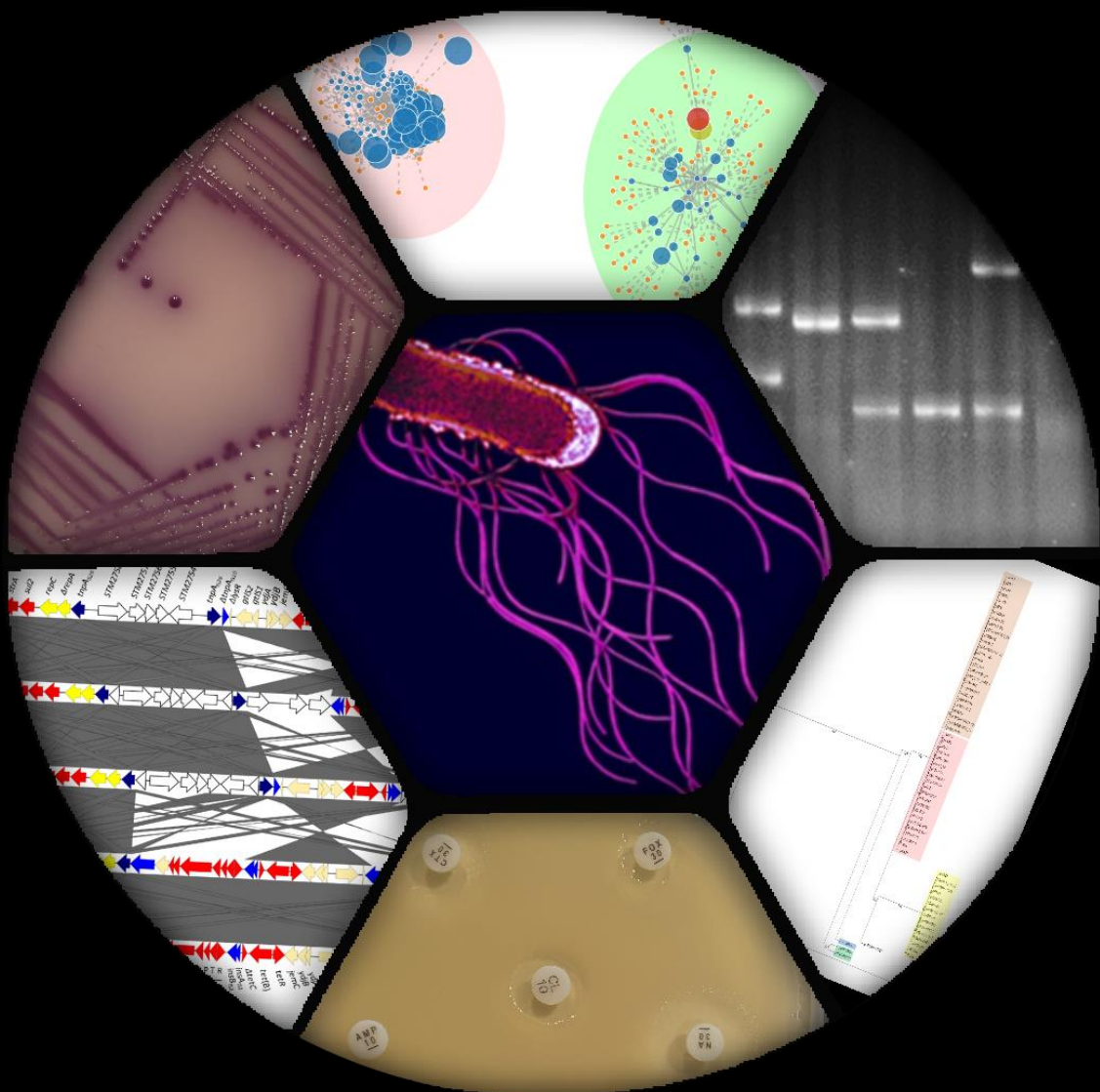


2021

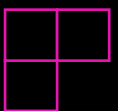


Universidad de Oviedo

**Seguimiento epidemiológico, genómica comparativa
y análisis filogenético de aislamientos monofásicos
de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y
otros serotipos con resistencias emergentes**



Xenia Vázquez Sánchez
Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular
Tesis Doctoral





UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL

**Seguimiento epidemiológico, genómica
comparativa y análisis filogenético de
aislamientos monofásicos de *Salmonella enterica*
serotipo Typhimurium y otros serotipos con
resistencias emergentes**

Xenia Vázquez Sánchez
2021



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro idioma: Seguimiento epidemiológico, genómica comparativa y análisis filogenético de aislamientos monofásicos de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium y de otros serotipos con resistencias emergentes	Inglés: Epidemiological surveillance, comparative genomics and phylogenetic analysis of monophasic isolates of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium and other serovars with emerging resistances
2.- Autor	
Nombre: Xenia Vázquez Sánchez	DNI/Pasaporte/NIE: .
Programa de Doctorado: Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

Los serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* constituyen una de las causas principales de infecciones bacterianas transmitidas por alimentos, con estimaciones de más de 100 millones de casos por año a nivel mundial. Estos serotipos originan normalmente una forma de infección intestinal autolimitada, conocida comúnmente como salmonelosis, que se caracteriza por diarrea más o menos severa, dolor abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y fiebre. Sin embargo, en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas, la bacteria puede extenderse fuera del intestino, originando infecciones sistémicas graves e incluso mortales. Aunque el tratamiento con agentes antimicrobianos no es necesario en casos de salmonelosis sin complicaciones, resulta esencial para combatir infecciones invasivas y prevenirlas en pacientes con factores de riesgo. En estas circunstancias, los antimicrobianos de elección son las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas, estas últimas contraindicadas en niños. En esta Tesis Doctoral abordó el estudio de aislamientos de *S. enterica* pertenecientes a la variante monofásica del serotipo Typhimurium, con elevada incidencia a nivel mundial, y de otros serotipos con resistencias emergentes. Se utilizaron para ello técnicas experimentales, en combinación con secuenciación genómica y análisis bioinformático.

La primera parte de la Tesis se centró en el estudio de la variante monofásica, determinando su incidencia en el Principado de Asturias (PA) durante el periodo 2008-2018. Se analizaron un total de 741 aislamientos de los cuales 615 (83%) procedían de muestras clínicas y los 126 restantes (17%) de alimentos. En base al fenotipo de resistencia, y a la presencia y localización de los genes responsables, estos aislamientos se asignaron a tres clones, los clones español y sud-europeo, que contienen plásmidos híbridos de resistencia-virulencia pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncC e IncR, respectivamente, y al clon europeo, siendo este último prevalente en el PA.

La secuenciación de genomas de aislamientos pertenecientes a los tres clones se llevó a cabo utilizando las plataformas Illumina y PacBio de segunda y tercera generación, respectivamente. Las lecturas obtenidas con Illumina (90-150 pb) fueron ensambladas mediante PLACNETw, lo cual permitió reconstruir los componentes de cada genoma: cromosoma y plásmido(s). En todos los casos, los genomas fueron anotados con PGAP, depositados en la base de datos pública GenBank y analizados con numerosas herramientas bioinformáticas.

La caracterización de los aislamientos permitió identificar variantes de los perfiles de resistencia de estos clones, asociadas a la pérdida, ganancia o pérdida y ganancia de uno o más genes de resistencia. De especial relevancia la adquisición, por parte del clon europeo, de genes de resistencia a cefalosporinas de espectro extendido sin o con resistencia simultánea a cefamicinas ($bla_{CTX-M-9}$, $bla_{CTX-M-14}$ y bla_{CMY-2}), fluoroquinolonas ($qnrA1$) y/o colistina ($mcr-9$), así como la localización de estos genes en plásmidos transferibles pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad: IncHI2 ($bla_{CTX-M-9}$, $mcr-9$ and $qnrA1$), IncII ($bla_{CTX-M-14}$) o IncX4). En relación a este clon, destaca también la selección post-tratamiento de resistencia a



fluoroquinolonas y piperacilina/tazobactam, asociada a un caso atípico de neumonía que afectó a un paciente ingresado en la UCI de un hospital del PA. La adquisición de resistencia a piperacilina/tazobactam es de gran importancia, ya que esta combinación de fármacos se administra de forma empírica para el tratamiento de pacientes con infecciones invasivas ingresados en UCI.

El análisis bioinformático, además de corroborar y complementar los resultados obtenidos de manera experimental, aportó información adicional sobre los aislamientos objeto de estudio, en concreto sobre secuencias tipo (ST), genes de resistencia a metales pesados y antisépticos, genes de virulencia y elementos genéticos implicados en resistencia y/o virulencia, como integrones, secuencias de inserción, transposones, plásmidos, regiones de resistencia e islas genómicas, islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs) y profagos. Los resultados obtenidos mostraron una alta variabilidad intra- e inter-clon, especialmente en cuanto a perfiles de resistencia a antibióticos, perfiles plasmídicos y perfiles de profagos. Sin embargo, el contenido en genes virulencia y SPIs prácticamente coincidieron en todos los aislamientos analizados, encontrándose únicamente diferencias en el gen fágico *sopE*.

Finalmente, el análisis de las relaciones filogenéticas (intra e inter-clon), establecidas en base a SNPs detectados en los genoma completos, permitió la identificación de dos clados bien diferenciados. Uno de ellos agrupó a los aislamientos de los clones español y sud-europeo, con secuencia tipo ST19, y el otro a los del clon europeo, con secuencia tipo ST34. Dentro del primer clado, los aislamientos de los clones español y sud-europeo se separan claramente en dos sub-clados.

La segunda parte de la Tesis incluyó la secuenciación y caracterización de 26 aislamientos pertenecientes a los serotipos Bredeney, Corvallis, Enteritidis, Infantis, Kentucky, Kedougou, Paratyphi B y Typhimurium. En todos ellos se determinaron las bases genéticas de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas (genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-65} y *bla*_{CMY-2}), fluoroquinolonas (diferentes combinaciones de mutaciones puntuales en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC*, así como la presencia del gen de resistencia plasmídico *qnrS1*) y colistina (genes *mcr-1* y *mcr-4*). Muchos de estos genes se localizan en plásmidos, como IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}), IncI1 (*bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14}), IncF (*bla*_{CTX-M-14}), IncP (*bla*_{CTX-M-65}), IncC (*bla*_{CMY-2}), IncX4 (*mcr-1*), ColE10 (*mcr-4*) y ColE1 (*qnrS1*). El estudio también incluyó aislamientos clínicos de otras comunidades del norte de España (Cantabria y País Vasco) con resistencias relevantes.

La Tesis Doctoral puso de manifiesto la eficacia del análisis genómico, como complemento del trabajo experimental, para el seguimiento de bacterias resistentes y la determinación de las bases genéticas de la resistencia y la virulencia. El trabajo generó información exhaustiva sobre la situación de *S. enterica* en el PA, de gran interés a la hora de abordar la vigilancia epidemiológica y control de esta importante bacteria patógena.

RESUMEN (en Inglés)

Nontyphoidal serotypes of *Salmonella enterica* are one of the leading causes of foodborne bacterial infections, with estimates of more than 100 million cases per year worldwide. These serotypes normally cause a form of self-limited intestinal infection, commonly known as salmonellosis, characterized by more or less severe diarrhea, abdominal pain, nausea, vomiting, headache, and fever. However, in children, the elderly and the immunocompromised, the bacteria can spread outside the intestine, causing serious and even fatal systemic infections. Although treatment with antimicrobial agents is not necessary in cases of uncomplicated salmonellosis, it is essential to combat invasive infections and prevent them in patients with risk factors. In these circumstances, the antimicrobials of choice are broad-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones, the latter contraindicated in children. This Doctoral Thesis addressed the study of *S. enterica* isolates belonging to the monophasic variant of serotype Typhimurium, with a high incidence worldwide, and of other serotypes with emerging resistance. For this, experimental techniques were used, together with genome sequencing and bioinformatic analysis.

The first part of the Thesis focused on the study of the monophasic variant, determining its incidence in the Principality of Asturias (PA) during the period 2008-2018. A total of 741



isolates were analyzed, of which 615 (83%) came from clinical samples and the remaining 126 (17%) from food. Based on the resistance phenotype, the responsible genes and their location, these isolates were assigned to three clones, the Spanish and South-European clones, which contain hybrid resistance-virulence plasmids belonging to the IncC and IncR incompatibility groups, respectively, and the European clone, the latter being highly prevalent in PA.

Genome sequencing of isolates belonging to the three clones was carried out using the Illumina and PacBio platforms, of the second and third generation, respectively. The readings obtained with Illumina (90-150 bp) were assembled using PLACNETw, which made possible to reconstruct the components of each genome: chromosome and plasmid(s). In all cases, the genomes were annotated with PGAP, deposited in the public GenBank database, and analyzed with numerous bioinformatics tools.

The characterization of the isolates allowed the identification of variants of the resistance profiles of each clone, associated with the loss, gain or loss and gain of one or more resistance genes. Of special relevance is the acquisition, by the European clone, of extended spectrum cephalosporin resistance genes without or with concomitant resistance to cephamycins (*bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CMY-2}), fluoroquinolones (*qnrA1*) and/or colistin (*mcr-9*), as well as the location of these genes in transferable plasmids belonging to different incompatibility groups: IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}, *mcr-9* and *qnrA1*) and IncI1 (*bla*_{CTX-M-14}). With regard to this clone, the post-treatment selection for resistance to fluoroquinolones and piperacillin/tazobactam, associated with an atypical case of pneumonia that affected a patient admitted to the ICU of a PA hospital, also stands out. The acquisition of resistance to piperacillin/tazobactam is particularly relevant, since this combination of drugs is administered empirically for the treatment of patients with invasive infections admitted to the ICU.

The bioinformatic analysis, in addition to corroborating and complementing the results obtained experimentally, provided additional information on the isolates under study, specifically on sequence type (ST), antiseptic and heavy metal resistance genes, virulence genes and genetic elements involved in resistance and/or virulence, such as integrons, insertion sequences, transposons, plasmids, resistance regions and genomic islands, *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), and prophages. The results obtained showed high intra- and inter-clone variability, especially in terms of antibiotic resistance profiles, plasmid profiles and prophage profiles. However, the content of virulence genes and SPIs practically coincided in all the isolates analyzed, with differences only found in the phage gene *sopE*.

Finally, analysis of the phylogenetic relationships (intra and inter-clone), based on SNPs detected in the complete genomes, allowed the identification of two well differentiated clades. One of them grouped the isolates of the Spanish and South-European clones, with sequence type ST19, and the other those of the European clone, with sequence type ST34. Within the first clade, the isolates of the Spanish and South-European clones clearly separate into two sub-clades.

The second part of the Thesis included the sequencing and characterization of 26 isolates belonging to serotypes Bredeney, Corvallis, Enteritidis, Infantis, Kentucky, Kedougou, Paratyphi B and Typhimurium. In all of them, the genetic bases of resistance to broad-spectrum cephalosporins/cephamycins (genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-65}, and *bla*_{CMY-2}), fluoroquinolones (point mutations in the chromosomal genes *gyrA* and *parC*, as well as the presence of the plasmid resistance gene *qnrS1*) and colistin (genes *mcr-1* and *mcr-4*), were determined. Many of these genes were located in plasmids, such as IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}), IncI1 (*bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14}), IncF (*bla*_{CTX-M-14}), IncP (*bla*_{CTX-M-65}), IncC (*bla*_{CMY-2}), IncX4 (*mcr-1*), ColE10 (*mcr-4*), and ColE1 (*qnrS1*). The study also included clinical isolates from other communities in northern Spain (Cantabria and the Basque Country) with relevant resistance.

The Doctoral Thesis showed the effectiveness of genomic analysis, as a complement to experimental work, for the monitoring of resistant bacteria and the determination of the genetic bases of both resistance and virulence. The work generated exhaustive information on the situation of *S. enterica* in the PA, which is of great interest when it comes to addressing the epidemiological surveillance and control of this important pathogenic bacterium.



Que sea
eterno todo
aquello que nos
haga bien.

el principito.1

Para ti abuelo

Agradecimientos

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, la Dra. M^a Rosario Rodicio y el Dr. Víctor Ladero, porque esto solo ha sido posible gracias a ellos. Gracias por vuestra confianza, todo el cariño y paciencia depositada en mí. Gracias por vuestros consejos y por todo el apoyo recibido.

A la Dra. Rosaura Rodicio, por su implicación y trabajo. A Margarita Bances del Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias, por proporcionarnos las cepas analizadas en este estudio y la información relativa a las mismas. A Jürgen Henish de la Universidad de Osnabrück, por la colaboración prestada y su completa disposición siempre que ha sido necesario.

A Vane, Javi, María y Raquel, por enseñarme todo lo que sé y por todos vuestros consejos. Gracias por vuestra paciencia infinita y vuestro apoyo incondicional. A mis compañeros de Tesis, Carlos, Noemí y Pilar, que aunque hayamos coincidido poco, siempre he podido contar con ellos para todo.

Muchas gracias a Nacho, Leire y Anaís, por acudir en mi ayuda siempre que he tenido alguna duda. A todo el personal del área de Microbiología de la Universidad de Oviedo por su disponibilidad. Al personal del Servicio de Microbiología del HUCA, por vuestra acogida en el laboratorio y en los congresos, especialmente a Álvaro, por su paciencia y las risas “pinchando” gusanos.

A Paula, Priscila y Claudia por ser mi vía de escape y arreglar un mal día con solamente una palabra: ¿café? Por la paciencia en mis agobios, por comprender cuando desaparezco y por hacer que aunque el tiempo pase todo siga igual.

A mi familia, en especial a mi madre y hermana, por ser mi apoyo principal. Por motivarme a seguir siempre y a no rendirme nunca. Por apoyarme en cada decisión y aguantarme. A mi abuelo, que siempre confió en mí, por ser simplemente tú, y aunque no has podido terminar conmigo esta etapa, sé que estarías orgulloso.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido a que esta experiencia haya sido inolvidable,

Gracias!!

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. A thin pink line runs diagonally from the top left towards the bottom right, passing through the circles. Another thin pink line runs diagonally from the top right towards the bottom left, also passing through the circles. The circles are arranged in a descending staircase pattern from top to bottom.

ÍNDICE

*“La verdadera ignorancia no es la ausencia
de conocimientos, sino el hecho de negarse a
adquirirlos”*
(Karl Popper)

LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE TABLAS.....	xx
ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMEN.....	xxxí
1. INTRODUCCIÓN	
1.1.El género <i>Salmonella</i> : Contexto histórico, características generales y clasificación.....	1
1.2.Serotipos de <i>Salmonella</i> : Fórmula antigénica.....	4
1.2.1. Antígenos somáticos (O).....	5
1.2.2. Antígenos flagelares (H).....	6
1.2.3. Antígenos capsulares (K o Vi).....	8
1.3.Mecanismos de transmisión.....	9
1.3.1. Enfermedades causadas por <i>Salmonella</i>	10
1.3.1.1. Fiebres entéricas (tifoideas y paratifoideas).....	10
1.3.1.2. Infecciones intestinales (enteritis y enterocolitis), extraintestinales y septicemia.....	11
1.4. Factores de virulencia.....	12
1.4.1. Flagelos.....	13
1.4.2. Fimbrias.....	14
1.4.3. Islas de Patogenicidad.....	16
1.4.4. Otros genes de virulencia.....	23
1.4.5. Plásmidos de virulencia.....	24
1.4.6. Profagos.....	25
1.5. La pandemia silenciosa: Resistencia a antibióticos.....	26
1.5.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	28
1.5.1.1. Inhibición de la biosíntesis de la pared bacteriana.....	28
1.5.1.2. Inhibición de la síntesis proteica.....	30
1.5.1.3. Inhibición de la replicación del ADN.....	32
1.5.1.4. Inhibición de la transcripción.....	33
1.5.1.5. Inhibición de la síntesis de ácido fólico.....	33
1.5.1.6. Desestabilización de la membrana.....	33
1.5.1.7. Daños a macromoléculas celulares.....	34
1.5.2. Mecanismos de resistencia a biocidas.....	35
1.5.3. Mecanismos de resistencia a metales pesados.....	35
1.5.3.1. Resistencia a mercurio.....	36
1.5.3.2. Sistemas de homeostasis de cobre y resistencia a plata.....	37

1.5.3.3. Resistencia a arsénico.....	39
1.5.4. Elementos implicados en la transferencia horizontal de la resistencia.....	40
1.5.4.1. Sistema integrón casete génica.....	40
1.5.4.2. Elementos genéticostransponibles.....	41
1.5.4.2.1. Secuencias de inserción.....	42
1.5.4.2.2. Transposones.....	45
1.5.4.2.3. Plásmidos de resistencia.....	47
1.5.4.2.4. Plásmidos híbridos implicados en virulencia y resistencia.....	47
1.5.4.2.5. Elementos integrativos y conjugativos (ICEs) y elementos integrativos y movilizables (IMEs).....	47
1.6. Epidemiología.....	48
1.6.1. Variante 4,[5]:12:i:- del serotipo Typhimurium.....	49
1.6.2. Otros serotipos de interés.....	51
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
3.1. Procedencia de los aislamientos de <i>Salmonella</i>	59
3.1.1. Aislamientos de origen clínico.....	59
3.1.2. Aislamientos de alimentos.....	60
3.1.3. Aislamientos utilizados como control.....	60
3.2. Medios de cultivo y conservación de los aislamientos.....	60
3.3. Análisis fenotípico de la resistencia/susceptibilidad a antibióticos.....	60
3.3.1. Técnica de difusión disco-placa.....	61
3.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	63
3.4. Detección de genes de resistencia y elementos genéticos móviles mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	64
3.5. Técnicas de tipificación.....	67
3.5.1. Macrorrestricción genómica con XbaI seguida de electroforesis en campo pulsante.....	67
3.6. Análisis de plásmidos.....	69
3.6.1. Extracción y visualización de plásmidos.....	69
3.6.2. Tipificación de plásmidos.....	70
3.6.3. Conjugación.....	70
3.7. Secuenciación de genomas y análisis bioinformático.....	71
3.7.1. Secuenciación de genomas.....	71
3.7.2. Análisis de calidad, ensamblaje y anotación de los genomas secuenciados.....	73
3.7.2.1. Determinación de la calidad de las lecturas.....	73

3.7.2.2. Ensamblaje de <i>nov</i> o y reconstrucción de los genomas. Determinación de la calidad del ensamblaje.....	74
3.7.2.3. Anotación.....	76
3.7.3. Análisis de los genomas.....	77
3.7.3.1. Determinación de la especie y serotipo <i>in silico</i>	77
3.7.3.2. Análisis MLST <i>in silico</i>	77
3.7.3.3. Detección <i>in silico</i> de genes de resistencia a antimicrobianos.....	78
3.7.3.4. Detección y análisis de plásmidos <i>in silico</i>	79
3.7.3.5. Detección de genes de virulencia y análisis de las islas de patogenicidad <i>in silico</i>	80
3.7.3.6. Búsqueda de profagos <i>in silico</i>	81
3.7.4. Comparación y visualización de genomas.....	82
3.7.5. Reconstrucción de regiones de plásmidos, islas genómicas y otras regiones de resistencia.....	83
3.7.6. Análisis filogenético.....	83
4. RESULTADOS.....	85
4.1. Variante monofásica de Typhimurium.....	87
4.1.1. Seguimiento epidemiológico de la variante monofásica en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	87
4.1.1.1. Aislamientos de origen clínico.....	87
4.1.1.2. Aislamientos de alimentos.....	88
4.1.2. Secuenciación de genomas.....	89
4.1.3. Características generales de los aislamientos clínicos obtenidos en el Principado de Asturias durante 2008-2018.....	91
4.1.3.1. El clon español.....	91
4.1.3.1.1. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo.....	92
4.1.3.1.2. Caracterización de la resistencia a antibióticos, metales pesados y compuestos derivados de amonio cuaternario.....	92
4.1.3.1.3. Análisis plasmídico.....	95
4.1.3.1.4. Identificación de genes de virulencia.....	97
4.1.3.1.4.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásicos.....	97
4.1.3.1.4.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias.....	98
4.1.3.1.4.3. Islas de patogenicidad.....	98
4.1.3.1.4.4. Otros genes de virulencia de localización cromosómica o plasmídica.....	99
4.1.3.1.4.5. Profagos.....	99
4.1.3.1.5. Comparación de los aislamientos clínicos del periodo 2008-2014 con los obtenidos en años anteriores.....	101
4.1.3.1.6. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos monofásicos pertenecientes al clon español.....	105
4.1.3.1.7. Caracterización de plásmido pUO-STmRV1 del clon español...	106

4.1.3.1.7.1. Sub-tipificación <i>in silico</i>	106
4.1.3.1.7.2. Análisis de la secuencia de nucleótidos.....	107
4.1.3.1.7.3. El “backbone” de pUO-STmRV1.....	109
4.1.3.1.7.4. ADN exógeno adquirido por pUO-STmRV1.....	110
4.1.3.1.7.5. Análisis filogenético.....	112
4.1.3.2. El clon sud-europeo.....	115
4.1.3.2.1. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo.....	115
4.1.3.2.2. Caracterización de la resistencia a antibióticos, metales pesados y compuestos derivados de amonio cuaternario.....	115
4.1.3.2.3. Análisis plasmídico.....	116
4.1.3.2.4. Identificación de genes y elementos genéticos implicados en virulencia.....	117
4.1.3.2.4.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásico.....	117
4.1.3.2.4.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias.....	119
4.1.3.2.4.3. Islas de patogenicidad y otros genes de localización cromosómica o plasmídica.....	119
4.1.3.2.4.4. Profagos.....	119
4.1.3.2.5. Relaciones filogenéticas entre aislamientos monofásicos pertenecientes al clon sud-europeo.....	120
4.1.3.3. El clon europeo.....	121
4.1.3.3.1. Asignación al clon.....	121
4.1.3.3.2. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo.....	124
4.1.3.3.3. Análisis plasmídico.....	124
4.1.3.3.4. Análisis genómico de dos aislamientos del periodo 1997-2007...125	
4.1.3.3.4.1. Organización de la región RR y bases genéticas del fenotipo monofásico.....	125
4.1.3.3.4.2. Resistencia a metales pesados.....	128
4.1.3.3.4.3. Identificación de genes y elementos genéticos implicados en virulencia.....	130
4.1.3.3.4.3.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásico.....	130
4.1.3.3.4.3.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias.....	130
4.1.3.3.4.3.3. Islas de patogenicidad y otros genes de localización cromosómica o plasmídica.....	130
4.1.3.3.4.3.4. Profagos.....	130
4.1.3.3.5. Aislamientos ST34 resistentes a cefotaxima.....	131
4.1.3.3.5.1. Origen de los aislamientos.....	131
4.1.3.3.5.2. Caracterización general de los aislamientos.....	131
4.1.3.3.5.3. Regiones cromosómicas que codifican resistencia a metales pesados y antibióticos: Bases genéticas del fenotipo monofásico.....	135
4.1.3.3.5.4. Bases genéticas de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.....	136
4.1.3.3.6. Neumonía nosocomial causada por el clon monofásico europeo en un paciente inmunocompetente.....	137
4.1.3.3.6.1. Descripción del caso.....	138
4.1.3.3.6.2. Caracterización bacteriana.....	139
4.1.3.3.7. Relaciones filogenéticas existentes entre los aislamientos del clon europeo.....	140

4.1.4. Características generales de los aislamientos de alimentos obtenidos en el Principado de Asturias durante 2008-2018.....	141
4.1.4.1. Los clones español y sud-europeo.....	141
4.1.4.2. El clon europeo.....	144
4.1.4.2.1. Asignación al clon.....	144
4.1.4.2.2. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo.....	145
4.1.4.2.3. Análisis plasmídico.....	146
4.1.4.2.4. Aislamientos ST34 resistentes a colistina.....	146
4.1.4.2.4.1. Origen y caracterización general de los aislamientos.....	146
4.1.4.2.4.2. Caracterización del entorno genético y estudio de la transferencia de los genes <i>mcr-1.1</i> y <i>bla</i> CMY-2.....	150
4.1.5. Análisis filogenético de los aislamientos monofásicos.....	153
4.2. Otros serotipos con resistencias emergentes.....	156
4.2.1. Seguimiento en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	156
4.2.1.1. Aislamientos de origen clínico.....	156
4.2.1.2. Aislamientos de alimentos.....	157
4.2.2. Secuenciación de genomas.....	157
4.2.3. Características generales de los aislamientos con resistencias emergentes.....	158
4.2.4. Aislamientos del clon emergente ST198 del serotipo Kentucky con resistencia a ciprofloxacino.....	163
4.2.4.1. Caracterización general de los aislamientos.....	163
4.2.4.2. Bases genéticas de la resistencia a ciprofloxacino.....	164
4.2.4.3. Diversidad de la isla genómica SGI1-K.....	165
4.2.4.4. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos.....	168
5. DISCUSIÓN.....	169
6. CONCLUSIONES.....	193
7. BIBLIOGRAFÍA.....	197
8. ANEXOS.....	223

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bacterias del género *Salmonella* 1

Figura 2. Medios diferenciales para el aislamiento de *Salmonella*.....2

Figura 3. Clasificación actual del género *Salmonella*.....3

Figura 4. Estructura del lipopolisacárido.....6

Figura 5. Mecanismo de alternancia de fases flagelares en *Salmonella*7

Figura 6. Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella*.....10

Figura 7. Representación esquemática de los diferentes factores de virulencia de *S. enterica*.....12

Figura 8. Regulación transcripcional del ensamblaje flagelar.....14

Figura 9. Mecanismo de actuación de agentes antibióticos y de resistencia de los mismos.....28

Figura 10. Organización de los genes *mer*36

Figura 11. Organización de diferentes operones implicados en la homeostasis del cobre y plata.38

Figura 12. Organización del operón *ars*.....38

Figura 13. Representación esquemática de integrones.....40

Figura 14. Esquema de la transposición replicativa mediada por una secuencia de inserción.....43

Figura 15. Antibiograma según el método de difusión disco-placa.....62

Figura 16. Esquema de la técnica de microdilución en placa.....64

Figura 17. Etapas del protocolo de electroforesis en campo pulsante (PFGE).....68

Figura 18. Análisis de la calidad de lecturas con el software FastQC.....73

Figura 19. Evolución de los aislamientos de origen clínico pertenecientes a *Salmonella enterica* y a la variante monofásica de Typhimurium registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....87

Figura 20. Evolución de los aislamientos de la variante monofásica recuperados de alimentos en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....88

Figura 21. Reconstrucción de un genoma bacteriano analizado a través de PLACNETw.....90

Figura 22. Caracterización de la región *fljAB-hin* en los aislamientos del clon español.....98

Figura 23. Árbol filogenético basado en los SNPs identificados en el genoma completo de los aislamientos monofásicos del clon español secuenciados en este trabajo utilizando como control la cepa LSP 389/97.....106

Figura 24. Organización de los genes de pUO-STmRV1.....108

Figura 25. Comparación del “backbone” de pUO-STmRV1 con el de pR148, utilizado como referencia de los plásmidos IncC.....110

Figura 26. Relaciones filogenéticas de pUO-STmRV1.....114

Figura 27. Caracterización de la región *fljAB-hin* en los aislamientos del clon sud-europeo analizados.....117

Figura 28. Relaciones filogenéticas existentes entre los aislamientos monofásicos sud-europeos del Principado de Asturias recuperados durante el periodo 2008-2018121

Figura 29. Organización genética de las regiones de tetraresistencia encontradas en los aislamientos control del clon monofásico europeo127

Figura 30. Caracterización de la región *fljAB-hin* en el aislamiento LSP 207/07129

Figura 31. Organización genética de la SGI-4 encontrada en los aislamientos control del clon europeo 129

Figura 32. Estructura de la región RR de los aislamientos clínicos resistentes a cefotaxima136

Figura 33. Entornos de los genes *bla_{CTX-M-14}* y *bla_{CTX-M-9}*137

Figura 34. Árbol filogenético construido en base a los SNPs del genoma completo de los aislamientos del clon europeo analizados en este estudio utilizando como referencia la cepa LSP 207/07140

Figura 35. Perfiles de macrorrestricción PFGE-XbaI identificados en los aislamientos del clon europeo resistentes a colistina y dendograma de similitud donde se muestra la relación entre ellos146

Figura 36. Análisis plasmídico de los aislamientos de origen alimentario pertenecientes al clon monofásico europeo148

Figura 37. Entorno genético de los genes *mcr-1.1* y *bla_{CMY-2}* detectados en los aislamientos procedentes de alimentos del clon monofásico europeo150

Figure 38. Organización genética de las regiones de tetraresistencia encontradas en los aislamientos de origen alimentario del clon monofásico europeo resistentes a colistina153

Figura 39. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos pertenecientes a los clones español, sud-europeo y europeo basado en el número de SNPs identificados en el genoma completo.155

Figura 40. Evolución de los aislamientos de origen clínico pertenecientes a diferentes serotipos analizados en esta Tesis Doctoral, registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018156

Figura 41. Evolución de los aislamientos pertenecientes a diferentes serotipos analizados en esta Tesis Doctoral. recuperados en el PA de muestras de alimentos, durante el periodo 2008-2018157

Figura 42. Variación de SGI1-K (SGI1-P) en *Salmonella enterica* serotipo Kentucky ST198-CipR de hospitales españoles167

Figura 43. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los aislamientos de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky ST198-CipR de hospitales españoles (resaltados en negrita) y otros aislamientos de Kentucky ST198168

Figura 44. Número de aislamientos de origen clínico pertenecientes a *Salmonella enterica*, así como a los serotipos Enteritidis, Typhimurium y la variante monofásica, registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018173

Figura 45. Aislamientos pertenecientes a los serotipos Enteritidis, Typhimurium y su variante monofásica procedentes de alimentos recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018174

Figura 46. Comparación BRIG (Blast Ring Image Generator) de pUO-STmRV1 con pR148 (no. de acceso JX141473; IncC), R46 (AY046276; IncN), pR64 (AP005147; IncI), R100 (AP000342; IncFII), y pSLT (el plásmido virulencia IncFIIs-IncFIb específico de Typhimurium; AE006471).....178

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del género *Salmonella* y número de serotipos identificados en cada especie y subespecie4

Tabla 2. Distribución de los diferentes operones fimbriales identificados en *Salmonella*.....15

Tabla 3. Características y distribución de las SPIs identificadas en *Salmonella*.....17

Tabla 4. Función de los genes asociados con virulencia en *Salmonella*24

Tabla 5. Genes fágicos y su papel en la virulencia de *Salmonella*26

Tabla 6. Concentraciones de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de diversos agentes antimicrobianos63

Tabla 7. Condiciones de las diferentes etapas de la amplificación por PCR.....65

Tabla 8. Cepas bacterianas empleadas como controles negativos y positivos.....65

Tabla 9. Parámetros relativos a los ensamblajes de dos genomas de la variante monofásica, secuenciados con Illumina y obtenidos con PLACNETw89

Tabla 10. Características generales de los aislamientos monofásicos del clon español analizados en este trabajo.....91

Tabla 11. Origen, fagotipo y perfiles de resistencia de los aislamientos clínicos del clon español detectados en el Principado de Asturias durante el período 2008-2018.....93

Tabla 12. Contenido de genes de resistencia a metales pesados en aislamientos clínicos del clon monofásico español detectados en el Principado de Asturias durante el período 2008-2018.....94

Tabla 13. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon español recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....96

Tabla 14. Contenido en profagos detectado en los aislamientos monofásicos del clon español..100

Tabla 15. Datos generales de los aislamientos monofásicos del clon español pertenecientes al periodo 1997-2007.....101

Tabla 16. Perfiles de resistencia y plásmidos, y genes de virulencia plasmídicos detectados en los aislamientos del periodo 1997-2007.....102

Tabla 17. Contenido en profagos y perfil de los aislamientos pertenecientes al periodo 1997-2007.....105

Tabla 18. Sub-tipificación por PCR *in silico* de pUO-STmRV1 y de otros plásmidos IncC.....107

Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa LSP 389/97 portadora del plásmido pUO-STmRV1 frente a metales pesados.....112

Tabla 20. Características generales de los aislamientos monofásicos de origen clínico pertenecientes al clon sud-europeo registrados en el Principado de Asturias durante 2008-2018.....115

Tabla 21. Fenotipo y genes de resistencia identificados en los aislamientos pertenecientes al clon monofásico sud-europeo de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.....116

Tabla 22. Genes de resistencia a metales pesados identificados en los aislamientos secuenciados del clon monofásico sud-europeo de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	116
Tabla 23. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon sud-europeo recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	117
Tabla 24. Contenido en profagos de los aislamientos monofásicos del clon sud-europeo de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	119
Tabla 25. Perfiles de resistencia (fenotipo y genes responsables) de aislamientos del clon monofásico europeo obtenidos en hospitales del Principado de Asturias durante 2008-2018....	122
Tabla 26. Características generales, genotipo y genes de resistencia de los aislamientos control del clon europeo.....	125
Tabla 27. <u>Concentración mínima inhibitoria (CMI)</u> de LSP 45/05 y LSP 207/07 frente a metales pesados.....	128
Tabla 28. Contenido en profagos y perfiles de LSP 45/05 y LSP 207/07.....	131
Tabla 29. Características de los aislamientos ST34 recuperados en hospitales del Principado de Asturias y País Vasco.....	133
Tabla 30. Características clínicas y microbiológicas de los aislamientos monofásicos (4: i :-) ST34 de <i>Salmonella enterica</i> recuperados en el HUCA de un paciente con neumonía.....	139
Tabla 31. Características generales de los aislamientos del clon español y sud-europeo procedentes de alimentos registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	141
Tabla 32. Genes de resistencia a metales pesados y antisépticos identificados en los aislamientos del clon español procedentes de alimentos del Principado de Asturias en el periodo 2008-2018.....	142
Tabla 33. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon español procedentes de alimentos recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	143
Tabla 34. Contenido en profagos y perfil de los aislamientos monofásicos del clon español procedentes de alimentos del Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.....	143
Tabla 35. Perfiles de resistencia (fenotipo y genes responsables) de aislamientos del clon monofásico europeo procedentes de alimentos del Principado de Asturias.....	145
Tabla 36. Origen y propiedades de aislamientos ST34 resistentes a colistina de origen alimentario de la variante monofásica de Typhimurium.....	149
Tabla 37. Frecuencias de conjugación / movilización de los plásmidos IncX4, IncHI2 e Inc11-I(α) de cepas resistentes a la colistina transmitidas por alimentos de la variante monofásica ST34 de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium.....	151

Tabla 38. Características generales de los aislamientos clínicos analizados en este apartado158

Tabla 39. Características generales de los aislamientos procedentes de muestras alimentarias analizados en este apartado.....159

Tabla 40. Características generales, fenotipo y genotipo de resistencia de los aislamientos de origen clínico y de alimentos pertenecientes a diferentes serotipos analizados en este trabajo...161

Tabla 41. Origen y características de los aislamientos ST198 de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky procedentes de hospitales del norte de España.....164

A decorative graphic on the right side of the page consists of three overlapping circles in shades of pink and magenta, arranged vertically. Two thin, dark pink lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom circle.

ABREVIATURAS

“La perfección es una pulida colección de errores”

(Mario Benedetti)

AAC: N-acetil transferasas
AAD: •O-adenitransferasas
AMK: Amikacina
AMP: Ampicilina
AMP/SAM: Ampicilina sulbactam
AMX: Amoxicilina- ácido clavulánico
ANT: O-nucleotidiltransferasas
APH: O-fosfotranferasas
ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosómico
ARO: “Antimicrobial Resistance Ontology”
AZM: Azitromicina
bcf: “Bovine colonization factor”
BLAST: “Basic Local Alignment Search Tool”
BLEE/BLEA: β-lactamasas de espectro extendido o ampliado
Bk: “Backbone”
BKC: Cloruro de Benzalconio
BRIG: “Blast Ring Image Generator”
BWA: “Burrows- Wheeler Alignment”
CA: Clínica Asturias
CARD: “The Comprehensive Antibiotic Research Database”
CBS: “Cell Ssuspension Buffer”
CDC: “Centers for Disease Control and Prevention”
CDS: “Coding DNA Sequence”
CGE: “Center for Genomic Epidemiology”
CHL: Cloranfenicol
CIBIR: Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
cgMLST: “Core genoma” MLST
CIP: Ciprofloxacino
CIP-R: Aislamientos resistentes a ciprofloxacino
COL: Colistina
CTX: Cefotaxina
CTD: “Cytotoxic Distending Toxin”
CHASRI: “Copper Homeostasis and Silver Resistance Island”
CLSI: “Clinical Laboratory Standards Institute”
CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

ABREVIATURAS

- CNM:** Centro Nacional de Microbiología
- CR:** región común
- CRT:** “Cyclic Reversible Termination”
- CSI:** “Salmonella enterica centisome 7 genomic island”
- DDBJ:** “DNA Data Bank of Japan”
- dNTPs:** Desoxirribonucleótidos
- DR:** Duplicaciones directas
- DT:** Definite Type
- EBI:** “European Bioinformatics Institute”
- EDTA:** Ácido Étilen Diamino Tetra-Acético
- EFSA:** “European Food Safety Authority”
- EGM:** Elemento genético móvil
- EMB:** Agar eosina- azul de metileno
- EMBL:** “European Molecular Biology Laboratory”
- ERT:** Ertapemen
- EU:** Unión Europea
- EUCAST:** “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
- FEP:** Cefepima
- FHJ:** Hospital Fundación Jove
- FOX:** Cefoxitina
- HGAP:** “Hierarchical Genome Assembly Process”
- GC:** guanina-citosina
- GEF:** “Guanine nucleotide Exchange Factor” **GEN:** Gentamicina
- GM:** Gemifloxacina
- HA:** Hospital de Arrionadas
- HBB:** “Hook-basal body”
- Hcp:** “Hemolysin coregulated protein”
- HCov:** Hospital de Covadonga
- HJ:** Hospital de Jarrío
- HMN:** Hospital Monte Naranco
- HPCSO:** Hospital Público Carmen y Severo Ochoa
- HUA:** Hospital Universitario de Álava
- HUC:** Hospital Universitario de Cabueñes
- HUCA:** Hospital Universitario Central de Asturias
- HUD:** Hospital Universitario de Donostia
- HUMV:** Hospital Universitario Marqués de Valdecillas

HUSA: Hospital Universitario San Agustín
HVAB: Hospital Vital Álvarez Buylla
ICEs: Elementos Integrativos y Conjugativos
IMEs: Elementos Integrativos y Movilizables
Inc: grupo de incompatibilidad
INS: Instituto nacional de Silicosis
IR: Repetición invertida (Inverted Repeat)
IS: Secuencia de inserción
ISCR: “Insertion sequence common region”
KAN: Kanamicina
Kb: Kilobases
KD-I: Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8
KD-II: NaOH 2N, Tris-HCl 1M, SDS 3% (p/v), pH 12,5
KDO: Cetodesoxioctonato
LA: Agar Luria Bertani
LB: Caldo Luria Bertani
lpf: “Long polar fimbriae”
LPS: Lipopolisacárido
LSP: Laboratorio de Salud Pública
MAPK: “Mitogen activated protein kinases”
Mb: Megabases
MDR: Multirresistentes (de sus siglas en inglés Multi Drug Resistance)
MH: Medio Mueller Hinton
MIN: Minociclina
mTmV: “monophasic Salmonella Typhimurium V”
NIT: Nitrofurantoina
NJ: “Neighbor-Joining”
MLVA: “Multiple-locus variable number tándem repeat análisis”
NAL: Ácido nalidíxico
NCBI: “National Center for Bio**l**otechnology Information”
Nt: Nucleótidos
OMS: Organización Mundial de la Salud
orf: “Open Reading Frame” (pauta de lectura abierta)
P: Perfil plasmídico
PA: Principado de Asturias
PAIDB: “Pathogenicity Island DataBase”

ABREVIATURAS

PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos

pb: pares de bases

PBPs: “Penicilin bindig proteins”

PBRT: “PCR-Base Replicon Typing”

PCR: “Polymerase Chain Reaction”

pef: “Plasmid-encoded fimbriae”

PFGE: “Pulsed-Field gel electrophoresis”

PGAP: “Prokaryotic Genome Annotation Pipeline”

PH: Perfil de profagos PHASTER

PHAST: “PHAge Search Tool”

PHASTER: “PHAge Search Tool Enhanced Release”

pMLST: “plasmid Multi-Locus Sequence Typing”

PMQR: “Plasmid-Mediated Qinolone Resistance”

Pmr: “Polimyxin resistance”

PCT: “Pseudo Compound Transposons”

PTZ: Piperacilina Tazobactam

QAC: Compuestos de amonio cuaternario

QRDR: “Qinolone Resistance Determining Region”

R: Resistencia

RAXML: “Randomized Axelerated Maximum Likelihood”

RDNC: Reaction but Did not Conform

RGI: “Resistance Gene Identifier”

RI: Integrones de resistencia

RR: región de resistencia

RTX: “Repeats in ToXin”

RV: Resistencia-virulencia

SCV: “Salmonella-containing vacuole”

SI: Super-integrones

SGI: “Salmonella Genomic Island”

SMR: “Small multidrug resistance”

SMRT: “Single-Molecule Real-Time”

SNP: “Single Nucleotide Polymorphism”

SPE: Espectinomomicina

ST: Secuencia tipo

STR: Estreptomomicina

SPI: “Salmonella Pathogenicity Island”

spv: “Salmonella plasmid virulence”

SST1: Sistema de Secreción Tipo 1

SST3: Sistema de Secreción Tipo 3

SST6: Sistema de Secreción Tipo 6

stf: “Salmonella Typhimurium fimbriae”

SUL: Sulfonamidas

SXT: Trimetoprim sulfametoxazol

TAE: Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM)

Tafi: “Thin aggregative fimbriae”

TBE: Tris-Borato 45 mM, pH 8, EDTA 1mM

TE: Tris-HCl 10mM, EDTA

TET: Tetraciclina

TIC: Ticarcilina

TMP: Trimetoprim

TOB: Tobramicina

TU: “Translocatable Unit”

UPGMA: “Underweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages”

UT: “UnTypeable”

VFDB: “Virulence Factors Data Base”

VR: Virulencia-resistencia

wgMLST: “Whole genome” MLST

WT: “Wild Type”

ZMW: “Zero-Mode Waveguide”

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a bright pink center and a lighter pink outer ring. A thin, dark pink line runs diagonally from the top left towards the bottom right, passing through the circles. Another thin, dark pink line runs diagonally from the top right towards the bottom left, also passing through the circles. The circles are positioned in the upper right and lower right areas of the page.

SUMMARY

*“El verdadero conocimiento es conocer el alcance
de la propa ignorancia
(Confucio)*

Nontyphoidal serotypes of *Salmonella enterica* are one of the leading causes of foodborne bacterial infections, with estimates of more than 100 million cases per year worldwide. These serotypes normally cause a form of self-limited intestinal infection, commonly known as salmonellosis, characterized by more or less severe diarrhea, abdominal pain, nausea, vomiting, headache, and fever. However, in children, the elderly and the immunocompromised, the bacteria can spread outside the intestine, causing serious and even fatal systemic infections. Although treatment with antimicrobial agents is not necessary in cases of uncomplicated salmonellosis, it is essential to combat invasive infections and prevent them in patients with risk factors. In these circumstances, the antimicrobials of choice are broad-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones, the latter contraindicated in children. This Doctoral Thesis addressed the study of *S. enterica* isolates belonging to the monophasic variant of serotype Typhimurium, with a high incidence worldwide, and of other serotypes with emerging resistance. For this, experimental techniques were used, together with genome sequencing and bioinformatic analysis.

The first part of the Thesis focused on the study of the monophasic variant, determining its incidence in the Principality of Asturias (PA) during the period 2008-2018. A total of 741 isolates were analyzed, of which 615 (83%) came from clinical samples and the remaining 126 (17%) from food. Based on the resistance phenotype, the responsible genes and their location, these isolates were assigned to three clones, the Spanish and South-European clones, which contain hybrid resistance-virulence plasmids belonging to the IncC and IncR incompatibility groups, respectively, and the European clone, the latter being highly prevalent in PA.

Genome sequencing of isolates belonging to the three clones was carried out using the Illumina and PacBio platforms, of the second and third generation, respectively. The readings obtained with Illumina (90-150 bp) were assembled using PLACNETw, which made possible to reconstruct the components of each genome: chromosome and plasmid(s). In all cases, the genomes were annotated with PGAP, deposited in the public GenBank database, and analyzed with numerous bioinformatics tools.

The characterization of the isolates allowed the identification of variants of the resistance profiles of each clone, associated with the loss, gain or loss and gain of one or more resistance genes. Of special relevance is the acquisition, by the European clone, of extended spectrum cephalosporin resistance genes without or with concomitant resistance to cephamycins (*bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CMY-2}), fluoroquinolones (*qnrA1*) and/or colistin (*mcr-9*), as well as the location of these genes in transferable plasmids belonging to different incompatibility groups: IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}, *mcr-9* and *qnrA1*) and IncI1 (*bla*_{CTX-M-14}). With regard to this clone, the post-treatment selection for resistance to fluoroquinolones and piperacillin/tazobactam, associated with an atypical case of pneumonia that affected a patient admitted to the ICU of a PA hospital, also stands out. The acquisition of resistance to piperacillin/tazobactam is particularly relevant,

since this combination of drugs is administered empirically for the treatment of patients with invasive infections admitted to the ICU.

The bioinformatic analysis, in addition to corroborating and complementing the results obtained experimentally, provided additional information on the isolates under study, specifically on sequence type (ST), antiseptic and heavy metal resistance genes, virulence genes and genetic elements involved in resistance and/or virulence, such as integrons, insertion sequences, transposons, plasmids, resistance regions and genomic islands, *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs), and prophages. The results obtained showed high intra- and inter-clone variability, especially in terms of antibiotic resistance profiles, plasmid profiles and prophage profiles. However, the content of virulence genes and SPIs practically coincided in all the isolates analyzed, with differences only found in the phage gene *sopE*.

Finally, analysis of the phylogenetic relationships (intra and inter-clone), based on SNPs detected in the complete genomes, allowed the identification of two well differentiated clades. One of them grouped the isolates of the Spanish and South-European clones, with sequence type ST19, and the other those of the European clone, with sequence type ST34. Within the first clade, the isolates of the Spanish and South-European clones clearly separate into two sub-clades.

The second part of the Thesis included the sequencing and characterization of 26 isolates belonging to serotypes Bredeney, Corvallis, Enteritidis, Infantis, Kentucky, Kedougou, Paratyphi B and Typhimurium. In all of them, the genetic bases of resistance to broad-spectrum cephalosporins/cephamycins (genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-65}, and *bla*_{CMY-2}), fluoroquinolones (point mutations in the chromosomal genes *gyrA* and *parC*, as well as the presence of the plasmid resistance gene *qnrS1*) and colistin (genes *mcr-1* and *mcr-4*), were determined. Many of these genes were located in plasmids, such as IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}), IncII (*bla*_{CTX-M-1} and *bla*_{CTX-M-14}), IncF (*bla*_{CTX-M-14}), IncP (*bla*_{CTX-M-65}), IncC (*bla*_{CMY-2}), IncX4 (*mcr-1*), ColE10 (*mcr-4*), and ColE1 (*qnrS1*). The study also included clinical isolates from other communities in northern Spain (Cantabria and the Basque Country) with relevant resistance. The Doctoral Thesis showed the effectiveness of genomic analysis, as a complement to experimental work, for the monitoring of resistant bacteria and the determination of the genetic bases of both resistance and virulence. The work generated exhaustive information on the situation of *S. enterica* in the PA, which is of great interest when it comes to addressing the epidemiological surveillance and control of this important pathogenic bacterium.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. A thin, dark pink line starts from the top left and extends diagonally across the page, passing through the top-left edge of the largest circle and the top-left edge of the middle circle. Another thin, dark pink line starts from the top right and extends diagonally down towards the bottom right, passing through the top-right edge of the largest circle. The circles are arranged vertically, with the largest at the top, a medium-sized one in the middle, and a large one at the bottom right, partially cut off by the edge of the page.

INTRODUCCIÓN

*“Nada en la vida debe ser temido, solamente
comprendido”*
(Marie Curie)

1.1. El género *Salmonella*: Contexto histórico, características generales y clasificación

Si bien las primeras descripciones de la enfermedad tifoidea datan de 1643, no fue hasta principios del siglo XIX cuando Pierre Charles Alexandre Louis distinguió claramente la fiebre tifoidea de las “fiebres pestilenciales, pútridas, malignas, biliosas, mucosas y adinámicas” (Ledermann, 2003). Posteriormente, en 1880 el patólogo y bacteriólogo alemán Carl Joseph Eberth demostró la etiología de la enfermedad, poniendo fin a las teorías existentes hasta la fecha, al visualizar y recuperar un bacilo grueso, corto y no esporulado de diferentes autopsias de pacientes con fiebre tifoidea. Robert Koch también logró visualizar el bacilo en 1881 en riñón, bazo e hígado de un paciente fallecido, siendo finalmente cultivado por primera vez por Georg Theodor Gaffky en 1884, utilizando los medios de cultivo sólidos desarrollados por Koch. A principios del siglo XX, Almroth Edward Wrigth inició los primeros ensayos en humanos de una vacuna antitífica, a los que siguieron un gran número de investigaciones con el objetivo de mejorarla. El término *Salmonella* fue acuñado por Joseph Léon Marcel Lignières en 1900 en honor al doctor Daniel Elmer Salmon, el cual logró aislar a *Salmonella Choleraesuis*, considerada tradicionalmente como la especie tipo del género (Ledermann, 2003).

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacterales*, Clase γ -*Proteobacteria* dentro del dominio *Bacteria* (Garrity *et al.*, 2004). Son bacterias Gram negativas que se caracterizan por poseer una morfología bacilar cuyo tamaño oscila entre 0,7 x 2 y 1,5 x 5 μm y que no producen endosporas (Corral y Perea, 1992). Generalmente son móviles mediante flagelos peritricos (Figura 1), aunque el serotipo Gallinarum carece de flagelos y, por tanto, es inmóvil.



Figura 1. Bacterias del género *Salmonella*.

(A) *Salmonella* Typhimurium invadiendo un intestino humano (<http://factimages.com/salmonella-bacteria>).

(B) Flagelación peritrica de *Salmonella* Typhi (CDC, 2014; <https://www.cdc.gov/media/releases/2014/p0326-salmonella-data.html>).

INTRODUCCIÓN

Son bacterias anaerobias facultativas que poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Pueden fermentar compuestos carbonados con producción de gas entre ellos la glucosa, pero no la lactosa. Sin embargo, existen excepciones que no producen gas como los serotipos Typhi (cuyo reservorio y hospedador es el ser humano), Gallinarum y su biovar Pullorum (cuyo reservorio y hospedador son las gallináceas), así como variantes de serotipos productores de gas entre los que destaca Dublin por su frecuencia (Corral y Perea, 1992). Producen la enzima catalasa, son citocromo c oxidasa negativas y reducen nitratos a nitritos. Además, presentan resistencia frente a elevadas concentraciones de sales biliares y colorantes como el azul de metileno, la eosina, la fucsina ácida, el cristal violeta o el verde brillante, lo cual permitió diseñar medios selectivos para su aislamiento (Figura 2).

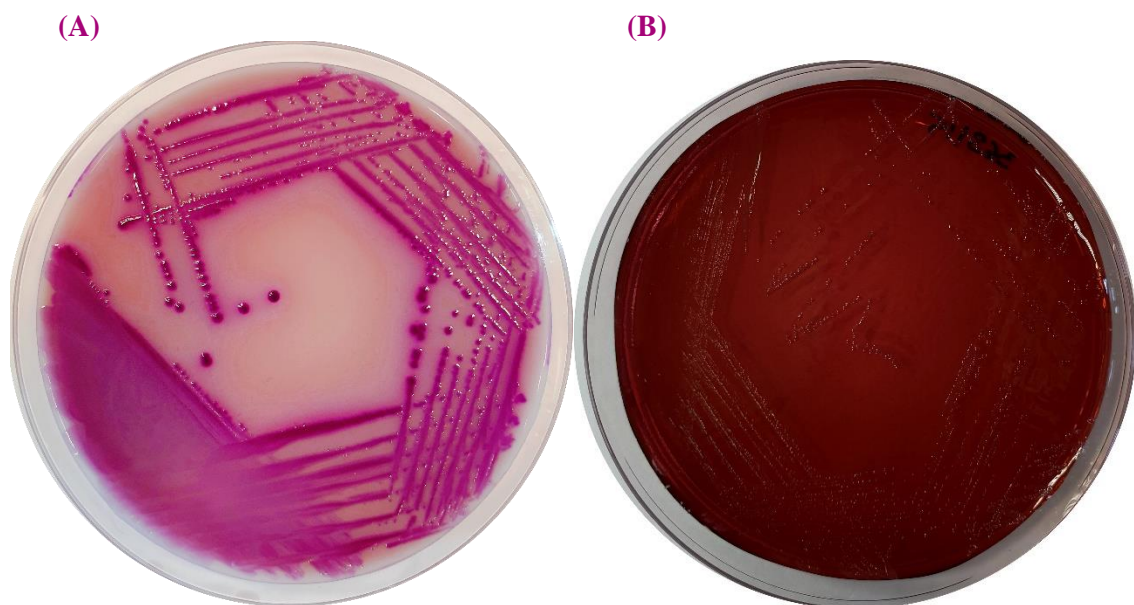


Figura 2. Medios diferenciales para el aislamiento de *Salmonella* (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oviedo).

(A) Agar cromogénico.

(B) Agar Levine (Eosin Methylene Blue Agar, EMB).

Salmonella es uno de los patógenos humanos más ubicuos en la naturaleza, siendo su hábitat principal el tracto intestinal de animales, incluidos los seres humanos. Sin embargo, también se puede encontrar en alimentos y en el ambiente. Las bacterias de este género pueden sobrevivir en un amplio rango de temperaturas (5-45°C), aunque su temperatura óptima se encuentra entre los 35 y 37°C. Son capaces de tolerar un rango de pH entre 4,5-9, creciendo con mayor facilidad con valores de 6,5-7,5. Generalmente, pueden desarrollarse bien en un intervalo de actividad de agua (a_w) de 0,945 a 0,999. Sin embargo, son capaces de sobrevivir durante largo tiempo con valores muy bajos, correspondientes a productos deshidratados y, en alimentos, son capaces de multiplicarse con valores de a_w iguales a 0,93 (Gledel, 1995; Mossel *et al.*, 2002).

Actualmente, dentro del género *Salmonella* se incluyen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Figura 3). La primera especie, a su vez, está dividida en seis subespecies (subsp.): *S. enterica* subsp. *enterica* (subsp. I), *S. enterica* subsp. *salamae* (subsp. II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (subsp. IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (subsp. IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (subsp. IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (subsp. VI). *S. bongori* es el miembro más antiguo del género y se corresponde con la antigua subsp. V (Tindall *et al.*, 2005; Grimont and Weill, 2007). Aunque *Salmonella* es una bacteria muy ubicua pudiendo encontrarse en ambientes muy diversos, existen diferencias entre de distribución entre especies y subespecies. La subsp. I (*enterica*) se asocia mayoritariamente a seres humanos y animales de sangre caliente, mientras el resto de subespecies de *S. enterica*, así como *S. bongori*, se encuentran principalmente en animales de sangre fría y en el medio ambiente.

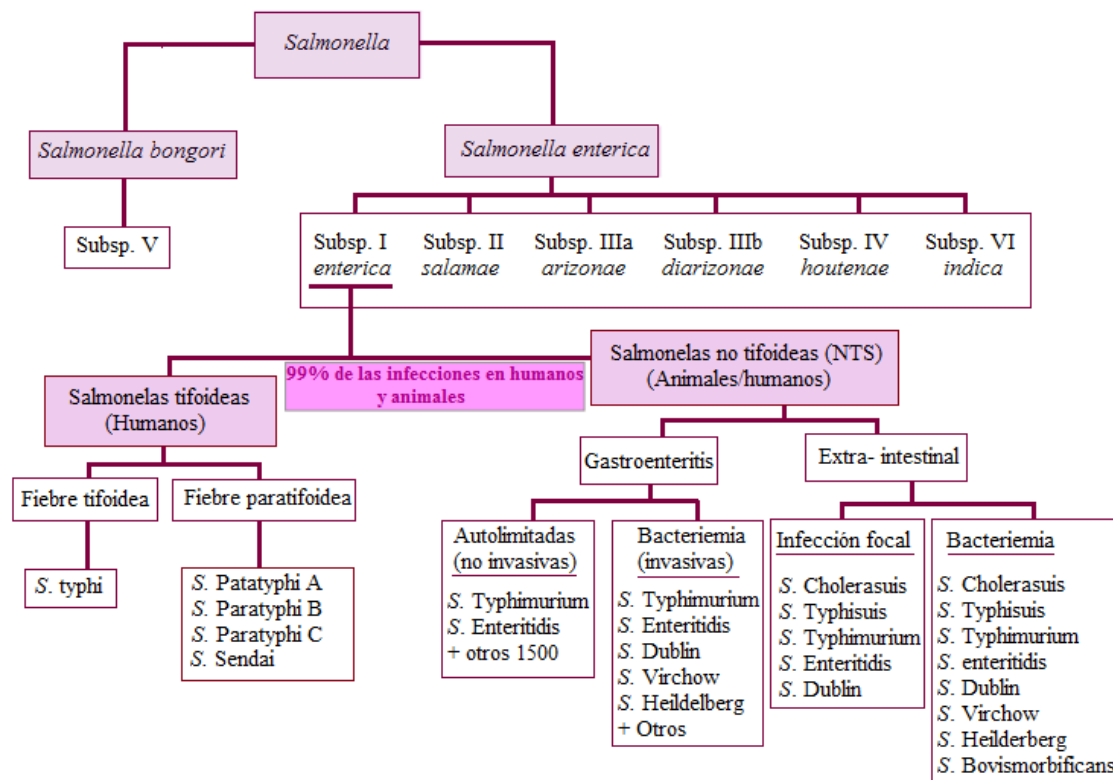


Figura 3. Clasificación actual del género *Salmonella* (Modificado de Langridge *et al.*, 2008).

El genoma de *Salmonella* consta de 4,8 Mb aproximadamente y tiene un contenido GC en torno al 50-3%. La cepa tipo del género es Typhimurium LT2, cuyo genoma incluye un cromosoma circular de 4,857 Kb (GC 53%) y un plásmido de virulencia de 94 Kb (GC 53%), pSLT (ver apartado 1.4.5). Contiene 4.489 pautas abiertas de lectura (*orf*, “open reading frame”), de los que 108 son pseudogenes, siendo el 55% de las cromosómicas comunes a otras enterobacterias (McClelland *et al.*, 2001). El número de genes core (conservados) en Typhimurium (3.846) es mayor que en el género *Salmonella* (2.882; Leekitcharoenphon *et al.*, 2012). Estos genes codifican proteínas implicadas en funciones esenciales como replicación,

transcripción y traducción. Por otro lado, el genoma accesorio de *Salmonella*, estimado en 2.882 genes es altamente variable e incluye plásmidos, profagos y genes de resistencia a antibióticos y/o metales pesados, así como numerosos genes implicados en virulencia (Songzhe *et al.*, 2015). De hecho, se estima que el 4% del genoma de la cepa tipo de *Salmonella* Typhimurium LT2, se requiere para la infección letal en ratón, lo cual supone unos 200 genes de virulencia (Bowe *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2001).

1.2. Serotipos de *Salmonella*: Fórmula antigénica

Las especies de *Salmonella* se clasifican en serotipos en base a antígenos de superficie: somáticos (O), flagelares (H) y, en algunos casos, capsulares (K o Vi). Esta clasificación se basa en las diferentes combinaciones de estos tres tipos de antígenos, dando lugar a lo que se conoce como fórmulas antigénicas, las cuales son características de serotipo y vienen recogidas en el esquema de Kauffmann-White-Le Minor (Grimont and Weill, 2007).

La primera clasificación basada en estos antígenos fue propuesta por Philip Bruce White en 1926, la cual fue modificada posteriormente por Fritz Kauffmann. La primera publicación del esquema de serotipificación data de 1934 y comprendía un total de 144 serotipos, los cuales fueron incrementándose hasta un total de 958 serotipos cuando Kauffmann se retiró en 1964. Posteriormente, Léon Le Minor retomó esta clasificación, identificando un total de 2.267 serotipos. Debido a que Le Minor describió la mayoría de los serotipos de *Salmonella*, esta clasificación pasó a llamarse esquema de White-Kauffmann-Le Minor. En la actualidad, se conocen 67 serogrupos, definidos por los antígenos O mayores o principales, y más de 2.600 serotipos establecidos en función de las diferentes combinaciones de antígenos O, H y K, de los cuales más de 1.500 pertenecen a la subespecie I de *S. enterica* (Tabla 1; Popoff, 2001; Popoff *et al.*, 2004; Grimont and Weill, 2007; Guibourdenche *et al.*, 2010). Esta clasificación incluye todas las fórmulas antigénicas identificadas, siendo utilizada por los Centros de Referencia, así como por otros laboratorios a nivel mundial.

Tabla 1. Clasificación del género *Salmonella* y número de serotipos identificados en cada especie y subespecie.

Especie y subespecie de <i>Salmonella</i>	Nº de serotipos dentro de la especie
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1,547
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	513
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	100
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	341
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i>	23

(Datos obtenidos de Guibourdenche *et al.*, 2010).

1.2.1. Antígenos somáticos (O)

Los antígenos somáticos son moléculas complejas que se caracterizan por ser termoestables y alcohol-resistentes. Son polisacáridos pertenecientes al lipopolisacárido (LPS) localizado en la membrana externa de la pared celular de bacterias Gram negativas (Figura 4). El LPS es un factor de virulencia importante en la mayoría de estas bacterias (Luk *et al.*, 1993), y tiene dos funciones principales. En primer lugar, su localización en la membrana externa proporciona una función protectora, actuando como mecanismo de defensa frente a condiciones ambientales adversas (Silipo *et al.*, 2012). En segundo lugar, el LPS se encuentra altamente conservado en todas las bacterias Gram negativas. Esto hace que sea un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), esencial para el reconocimiento de microorganismos por las células del sistema inmune innato (Akira and Takeda, 2004). El LPS consta de 3 dominios genética, biológica y químicamente diferentes:

- **Lípido A:** Constituye la zona más interna del LPS, anclando toda la molécula a la membrana externa de la pared celular bacteriana. Está formado por un disacárido al que se unen ácidos grasos, constituyendo en su conjunto la endotoxina con actividad tóxica. Juega un papel importante en la rigidez y tensión de la membrana mediante la sustitución de los azúcares por fosfatos que cargan negativamente la membrana y, por tanto, está involucrado en la resistencia de las bacterias al estrés provocado por factores externos (Alexander and Rietschel, 2001).
- **Polisacárido central o núcleo del polisacárido (core):** Formado por varios azúcares, algunos de ellos poco comunes. Está compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), azúcares de siete átomos de carbono (heptosas), glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina.
- **Polisacárido o cadena lateral O:** Constituye la región más externa del LPS formada por una cadena heteropolisacarídica, altamente variable en longitud y composición, debido al polimorfismo que presenta la región cromosómica *rfb*, responsable de su síntesis. Está unida al núcleo y consta por lo general de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa (hexosas), así como uno o más didesoxiazúcares poco frecuentes. Consiste en una secuencia repetida de unidades de trisacárido o pentasacárido lineal o bien pueden ser polímeros de oligosacáridos ramificados de cuatro a seis azúcares. La repetición de estas secuencias de azúcares da lugar a la formación de un largo polisacárido O constituyendo el antígeno O, el cual presenta una alta variabilidad (Mayer *et al.*, 1989).

Los antígenos O se clasifican en antígenos O mayores y menores, los cuales se indican mediante números separados por comas. Los antígenos O mayores, también conocidos como factores principales, son los que definen el grupo antigénico o serogrupo. Por ejemplo, el antígeno somático 4 define el serogrupo B al que pertenece el serotipo Typhimurium, objeto de estudio en este trabajo. Los antígenos menores o factores secundarios, por su parte, siempre

están ligados a un factor principal, careciendo de valor discriminatorio, ya que pueden ser compartidos por serotipos pertenecientes a diferentes serogrupos. Algunos de ellos tienen su origen en cambios que afectan al antígeno mayor, como por ejemplo O:5 que se produce por la acetilación del polisacárido responsable de la especificidad del O:4, característico del serogrupo B. Otros se deben a conversión fágica (seroconversión), proceso denominado exteriorización ligada a la presencia de un profago, tal y como ocurre con el serotipo Typhimurium (Corral y Perea, 1992; Herrera-León *et al.*, 2004).

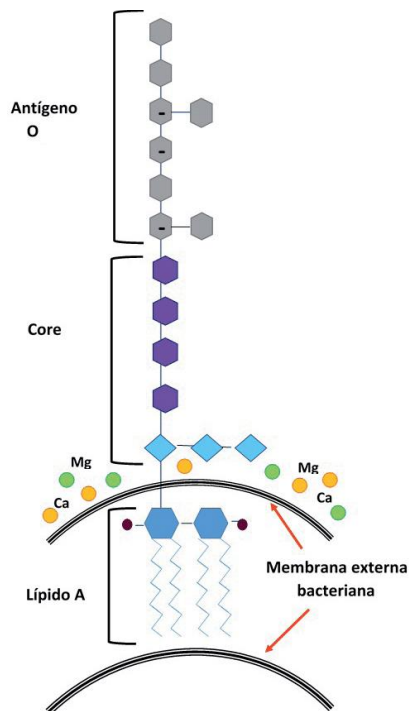


Figura 4. Estructura del lipopolisacárido (Tomado de Mendez and Barrera, 2015).

1.2.2. Antígenos flagelares (H)

La mayoría de los aislamientos de *Salmonella* son móviles mediante flagelos peritricos que se encuentran localizados en la superficie de la bacteria y son altamente inmunogénicos. Los antígenos flagelares son termolábiles y se deben a variaciones en la flagelina, la cual es la proteína estructural de los flagelos. Los extremos carboxilo (COOH) y amino (NH₂) terminales de los monómeros de flagelina se encuentran altamente conservados. Sin embargo, la región central presenta una gran variabilidad, siendo los determinantes antigénicos de esta región los que aportan la elevada diversidad observada.

La mayoría de las subespecies del género *Salmonella* son bifásicas o mayoritariamente bifásicas. Este es el caso de las subespecies, *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa) e *indica* (VI). El carácter bifásico reside en la capacidad de alterar la composición de los flagelos mediante un cambio en la expresión de los genes *fliC* y *fliB*, los cuales codifican los antígenos

flagelares de fase 1 o H1 y de fase 2 o H2, respectivamente. Los antígenos flagelares H1 también son conocidos como específicos, al ser característicos de cada serotipo, mientras que los antígenos flagelares H2 pueden ser comunes a varios serotipos. Una cepa de *Salmonella* sólo es capaz de expresar un tipo de flagelina en un momento determinado, es decir, los antígenos flagelares puede aparecer de forma alternativa en fase 1 o en fase 2. Esta expresión alternativa de dos formas de flagelina se conoce como variación de fase y se debe a un proceso reversible de inversión génica que puede ser modulado por factores externos. Este cambio de fase proporciona una ventaja obvia, ya que aquellas bacterias que durante una infección consigan cambiar de fase podrán evadir la respuesta inmune del hospedador. Esto se debe a que si están produciendo anticuerpos frente a la flagelina H1, aquellas bacterias que cambien de fase y produzcan antígenos H2 podrán escapar a la acción de dichos anticuerpos y viceversa (Corral y Perea, 1992; Relman and Falkow, 1997; Echeita *et al.*, 2001; Herrera-León *et al.*, 2004; 2006).

Los genes *fljB* y *fliC* están localizados en regiones separadas del cromosoma. El gen *fljB* forma el operón *fljAB* junto al gen *fljA*, el cual codifica el represor transcripcional de *fliC*. Este operón se localiza próximo al gen *hin* que codifica una recombinasa, encargada de catalizar la inversión de un fragmento de ADN cromosómico de 993 pb conocido como fragmento H. Este fragmento incluye el gen *hin*, el promotor del operón *fljAB* y, además, se encuentra flanqueado por repeticiones invertidas (IRs, *hixL* e *hixR*). Entre estas repeticiones es donde tiene lugar la recombinación específica de sitio catalizada por la recombinasa Hin, dando lugar a la inversión del fragmento. De esta forma, en función de la orientación del fragmento H, se producirá la expresión de una flagelina u otra. En un sentido, el promotor localizado en el fragmento H permitirá la transcripción del operón *fljAB*, dando lugar a la producción de la flagelina H2 y del represor de *fliC*, por lo que la síntesis de flagelina H1 queda reprimida. En sentido contrario, el operón *fljAB* no se expresa y, por tanto, no se producirá la flagelina H2 ni el represor. En ausencia de este se llevará a cabo la transcripción del gen *fliC*, permitiendo la expresión de la flagelina H1 (Figura 5; Herrera-León *et al.*, 2004).

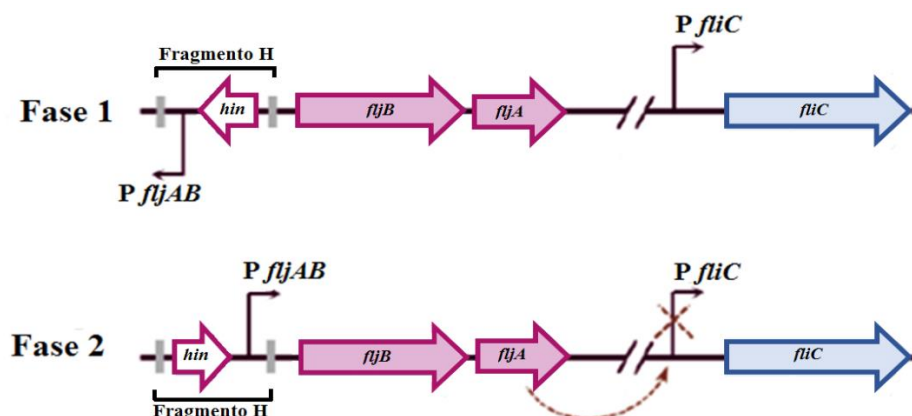


Figura 5. Mecanismo de alternancia de fases flagelares en *Salmonella* (Modificado de Mendez and Barrera, 2015).

Como se mencionó anteriormente, cuatro de las siete subespecies de *S. enterica* son mayoritariamente bifásicas. Sin embargo, existen excepciones como los serotipos Enteritidis y Typhi de *S. enterica* subsp. *enterica*, que son monofásicos, caracterizados por producir un solo tipo de flagelina, la H1, salvo en casos excepcionales. A este grupo pertenecen también las subespecies *arizonae* (IIIa), *houtenae* (IV), así como *S. bongori*. Además, existen variantes monofásicas de serotipos bifásicos, denominados serotipos monofásicos secundarios, los cuales han perdido la capacidad de sintetizar una de las flagelinas, generalmente la H2 codificada por el gen *fljB* (McQuiston *et al.*, 2008). Este es el caso de la variante monofásica del serotipo Typhimurium objeto de estudio en este trabajo (Switt *et al.*, 2009). Cabe destacar, finalmente, que los serotipos inmóviles carecen de antígenos H ya que no poseen flagelos.

La fórmula antigénica del serotipo Typhimurium es 1,**4**,[5],12:i:1,2 donde 1, 4, [5] y 12 son antígenos somáticos. El antígeno en negrita define el serogrupo, el número subrayado indica que se obtuvo mediante seroconversión, mientras que el antígeno entre paréntesis puede estar presente o no. El resto de la fórmula designa los antígenos flagelares H1 (i) y H2 (1,2). La variante monofásica de este serotipo carece de antígenos flagelares de fase 2, por lo que su fórmula antigénica es 4,[5],12:i:-.

1.2.3. Antígeno capsular (K)

El antígeno capsular es un polisacárido termolábil localizado en la cápsula de algunos serotipos de *S. enterica* subsp. *enterica*. Se trata de un polímero lineal del ácido α -1,4 (2-desoxi)-2-N-acetilgalacturónico, que puede estar acetilado en posición C3. Es producido por los serotipos Typhi y Paratyphi C y en ocasiones por cepas del serotipo Dublin (Raffatellu *et al.*, 2006). Este antígeno está codificado por el locus *viaB* de la isla de patogenicidad SPI-7 (SPI, “*Salmonella Pathogenicity Island*”; ver apartado 1.4.3) y es el responsable de la capacidad de evasión de la respuesta inmune del hospedador que poseen los serotipos tifoideos que serán comentados a continuación (Raffatellu *et al.*, 2006; 2008).

Desde el punto de vista médico, los serotipos de *S. enterica* se clasifican en tifoideos y no tifoideos. Dentro de los tifoideos se incluyen *Salmonella enterica* serotipo Typhi, Paratyphi A, B, C y Sendai, que se encuentra estrechamente relacionado con Paratyphi A (Feng *et al.*, 2019). Están adaptados al ser humano y son responsables de las fiebres entéricas, tifoidea o paratifoidea. Como excepción, Paratyphi B variedad Java tiene amplio rango de hospedador y no causa fiebre entérica, por lo que se considera junto con los serotipos no tifoideos. Estos últimos originan normalmente gastroenteritis, aunque también son capaces de producir infecciones locales extraintestinales e infecciones sistémicas. Algunos de ellos son altamente específicos como es el caso de Gallinarum, Dublin y Choleraesuis que colonizan a gallinas, vacas y cerdos, respectivamente, pero también pueden causar infecciones en el ser humano. Sin

embargo, la mayoría de los serotipos no tifoideos no presentan un hospedador específico y están ampliamente distribuidos (Uzzau *et al.*, 2000; Fierer and Guiney 2001).

1.3. Mecanismos de transmisión

Salmonella es uno de los patógenos humanos más ubicuos en la naturaleza, siendo su hábitat principal el tracto intestinal de animales. Sin embargo, también se puede encontrar en el tracto intestinal de humanos, en alimentos y en el ambiente.

Los serotipos tifoideos están restringidos al hombre y se transmite por ruta feco-oral a partir de la ingesta principalmente de agua, pero también de alimentos contaminados con heces de enfermos o portadores. Los alimentos involucrados suelen ser frutas y verduras, leche o productos lácteos y mariscos contaminados. Además, las moscas también pueden actuar como vehículo de transmisión contaminando los alimentos. Los serotipos no tifoideos son bacterias zoonóticas que también se transmiten por la vía feco-oral. La cadena de transmisión de estos últimos es compleja ([https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))); Figura 6). La bacteria llega a los animales domésticos a través de diferentes vías como la contaminación de pastos y aguas, piensos elaborados con restos de animales enfermos o portadores, contacto directo con animales silvestres portadores o con sus heces, entre otras. Además, los actuales sistemas de cría intensiva de ganado y aves facilitan la dispersión de la bacteria tanto de unos animales a otros como a sus productos (leche y huevos). Desde los animales *Salmonella* puede llegar al ser humano por diferentes vías:

1. Consumo de leche y derivados lácteos con contaminación fecal.
2. Consumo de huevos contaminados o de sus derivados, siendo este uno de los vehículos de transmisión más importantes. Normalmente la contaminación tiene lugar de forma externa durante la puesta, debido a que el oviducto y la cloaca desembocan en el mismo conducto. Sin embargo, en ocasiones la contaminación es transovárica, ocurriendo durante la formación del huevo.
3. Consumo de carne de mamíferos y aves, así como subproductos, cuya contaminación transcurre durante el proceso de evisceración en los mataderos donde la carne entra en contacto con el contenido intestinal.
4. Contaminación exógena o cruzada de cualquier tipo de alimento que, en principio no contiene a la bacteria, pero que puede llegar a él a través del contacto con utensilios o superficies contaminadas, agua incorrectamente tratada o por los manipuladores de alimentos.
5. Por último, pero no menos importante, también se puede producir una transmisión feco-oral de persona a persona.

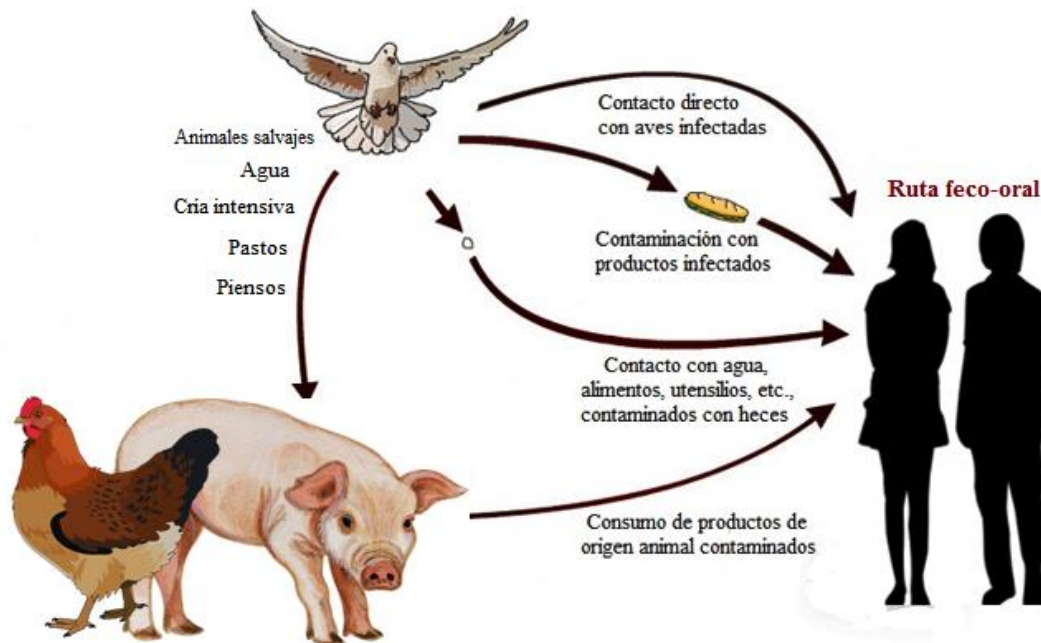


Figura 6. Rutas de transmisión de los serotipos no tifoideos de *Salmonella* (X. Vázquez, Trabajo Fin de Máster, 2016).

1.3.1. Enfermedades causadas por *Salmonella*

Una vez transmitida a seres humanos, *Salmonella*, dependiendo del estado del hospedador y del serotipo, puede ser eliminada por el sistema inmune de este sin llegar a causar enfermedad, establecer un estado de portador asintomático o provocar distintos tipos de enfermedad. Entre las enfermedades causadas por *Salmonella* podemos distinguir las fiebres entéricas, causadas por los serotipos tifoideos, de las infecciones intestinales (enteritis y enterocolitis), debidas a los serotipos no tifoideos.

1.3.1.1. Fiebres entéricas (tifoideas y paratifoideas)

Son infecciones invasivas ocasionadas por los serotipos tifoideos Typhi, Paratyphi A, B (excepto la variedad Java) y C, aunque también se han observado casos provocados por Sendai (Tracz *et al.*, 2006). Cuando *Salmonella* alcanza el intestino es capaz de colonizarlo y atravesar el epitelio intestinal a través de las células M hacia los ganglios linfáticos mesentéricos. En ellos se multiplica, liberándose posteriormente al torrente sanguíneo (bacteriemia primaria transitoria), donde es captada por los macrófagos del sistema retículo-endotelial permitiendo su dispersión y multiplicación activa en hígado, bazo y médula ósea. Esta parte de la enfermedad cursa sin síntomas y se corresponde con el periodo de incubación (5-9 días). Entonces, la bacteria regresa a la sangre (bacteriemia secundaria), dando lugar a un aumento de la temperatura corporal, astenia, anorexia y cefaleas. Posteriormente, la bacteria puede alcanzar la vesícula biliar e incluso re-infectar el tracto intestinal, provocando inflamación, ulceración y

necrosis a nivel del íleon distal. Esto puede ocasionar hemorragias y perforación intestinal con peritonitis y septicemia, principal causa de muerte por fiebre tifoidea (House *et al.*, 2001; Raffatellu *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2012).

Estas fiebres están ocasionadas por serotipos endémicos, y suelen afectar a países en vías de desarrollo, donde las deficientes condiciones higiénico-sanitarias favorecen la contaminación fecal del agua y alimentos (Crump *et al.*, 2010). En países desarrollados, las fiebres entéricas se limitan a unos pocos casos esporádicos vinculados con viajes a países endémicos o con inmigrantes (Meltzer and Schwartz, 2010).

1.3.1.2. Infecciones intestinales (enteritis y enterocolitis), extraintestinales y septicemia

La enfermedad más frecuente causada por los serotipos no tifoideos es la inflamación intestinal aguda conocida comúnmente como salmonelosis, que puede afectar al intestino delgado (enteritis) y/o al intestino grueso (enterocolitis).

Una vez en el lumen intestinal la bacteria coloniza e invade el epitelio. Inicialmente la *Salmonella* se adhiere a los receptores de la célula hospedadora (ver apartado 1.4.3), desencadenando la respuesta inmune del hospedador. Esta respuesta es inducida por el reconocimiento de las estructuras superficiales como el LPS, las fimbrias o los antígenos flagelares. A continuación, es capaz de adentrarse en el interior de los enterocitos por un proceso conocido como macropinocitosis o vía de las células M. La invasión de los enterocitos va a depender de un Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3-1) codificado por la SPI-1 (ver apartado 1.4.3). Tras su internalización, *Salmonella* reside en un compartimento membranoso denominado “*Salmonella*-Containing Vacuole” (SCV), la cual sufre un proceso de maduración y transloca a la bacteria hacia la lámina propia. Las bacterias que alcanzan la lámina propia son fagocitadas por los macrófagos, pero *Salmonella* pueden sobrevivir y multiplicarse en su interior, al menos a corto plazo, gracias a un segundo sistema de secreción de tipo 3 codificado por la SPI-2 (SST3-2).

Tras un periodo de incubación de 6-48 horas, aparecen síntomas como náuseas y vómitos, seguidos de dolor abdominal y deposiciones diarreicas. Normalmente cursa con fiebre, ya que se trata de una bacteria enteroinvasiva, y cólicos abdominales.

En personas adultas sanas y sin patologías previas, la enfermedad es generalmente autolimitada y no precisa tratamiento con antibióticos, dado que los mecanismos de defensa del hospedador son capaces de controlar y eliminar la infección. Sin embargo, en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas las infecciones intestinales pueden evolucionar a infecciones extraintestinales focales o dar lugar a infecciones sistémicas, potencialmente graves e incluso mortales, en cuyo caso sí es necesaria la administración de antibióticos. Además, la

multiplicación y lisis de la bacteria en la sangre puede degenerar en shock séptico por liberación de la endotoxina a nivel del sistema circulatorio.

1.4. Factores de virulencia

Los mecanismos de virulencia de *S. enterica* son complejos y varían tanto de unos serotipos a otros como entre cepas de un mismo serotipo (Marcus *et al.*, 2000). De hecho, se estima que aproximadamente el 4% del genoma de la cepa tipo de *Salmonella* Typhimurium, LT2, es necesario para que se produzca la infección letal en ratones, lo que supone la presencia de unos 200 genes de virulencia (Bowe *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2001). Los genes de virulencia pueden localizarse en el cromosoma o en plásmidos, y la mayor parte de ellos son aportados por el denominado genoma accesorio. Pueden encontrarse en forma de genes sueltos, en pequeñas agrupaciones denominadas islotes o en agrupaciones de gran tamaño, conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella* o SPIs.

Podemos distinguir dos tipos de factores de virulencia (Figura 7). Por un lado, **estructuras de superficie** que son además dianas del sistema inmune del hospedador, entre las que se incluye el LPS con actividad tóxica; los flagelos que dirigen la bacteria hacia el epitelio intestinal mediante quimiotaxis, permitiendo atravesar la capa mucosa; la cápsula, directamente relacionada con la capacidad invasiva del serotipo Typhi y de otros serotipos tifoideos; y las fimbrias. Por otro lado, existen **genes específicos de virulencia** localizados en el cromosoma (SPIs y profagos) o en plásmidos, los cuales codifican para diversos factores entre cuyas funciones están alterar la fisiología de las células del hospedador y/o proteger a la bacteria de los mecanismos de defensa del hospedador.

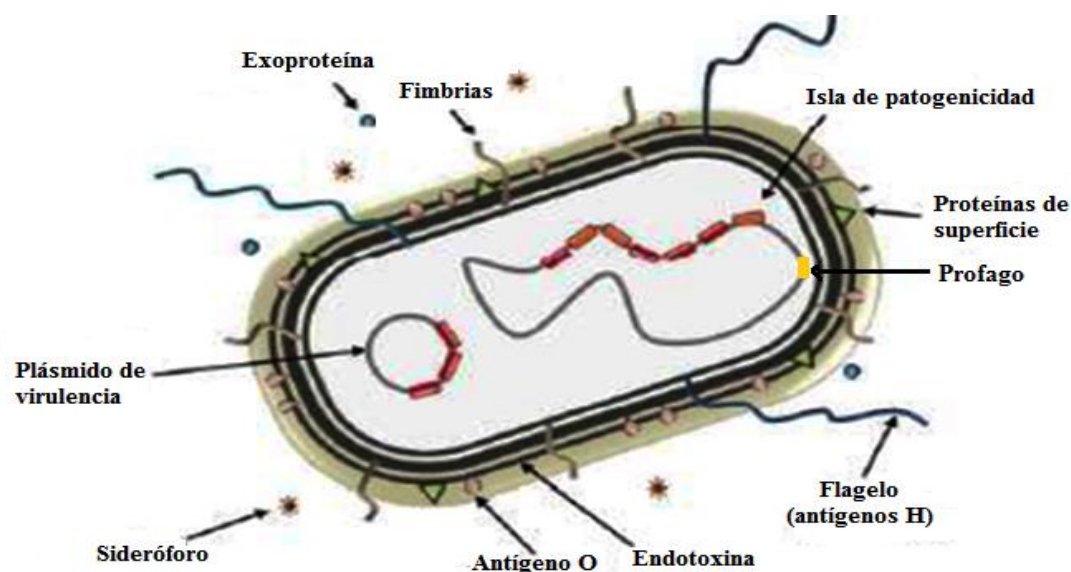


Figura 7. Representación esquemática de los diferentes factores de virulencia de *S. enterica* (Modificado de P. García, Tesis doctoral, 2013).

1.4.1. Flagelos

Los flagelos son estructuras filamentosas helicoidales localizadas en la superficie bacteriana y directamente implicadas en el desplazamiento de la mayor parte de las bacterias móviles. A nivel estructural podemos distinguir tres regiones: el filamento helicoidal largo, conectado a su vez al corpúsculo basal mediante un segmento corto y curvado denominado gancho. El filamento es la parte visible del flagelo, mientras que el corpúsculo basal se encuentra inmerso en la pared bacteriana. A grandes rasgos, el flagelo se va ensamblando "desde dentro hacia afuera", es decir, comenzando por el corpúsculo basal, avanzando hacia el codo y finalmente hacia el filamento. En la expresión y ensamblaje de sus componentes participan una serie de genes denominados genes flagelares (Figura 8; Kutsukake *et al.*, 1990). Los genes que codifican las proteínas estructurales se clasifican en tempranos, medios y tardíos, en función del momento en el que se requiera su transcripción (Chilcott and Hughes, 1998). A su vez, los promotores sujetos a regulación se clasifican en promotores de clase 1, clase 2 y clase 3. Se han identificado varios genes flagelares no por su efecto sobre la motilidad, sino porque se transcriben a partir de promotores flagelares, entre los que se encuentran *flhE*, *fliY*, *fliZ*, y *fliT*, cuyos productos carecen de efecto sobre la motilidad (Minamino *et al.*, 1994), así como los genes *fliZ* y *fliT* que tienen efectos positivos y/o negativos sobre la transcripción de otros genes flagelares (Kutsukake *et al.*, 1999). En *Typhimurium*, durante la síntesis de los flagelos participan aproximadamente 60 genes, que codifican proteínas estructurales y accesorias (no forman parte de la estructura del flagelo, sino que solo son requeridas durante el ensamblaje). La formación del flagelo comienza con la transcripción del operón *flhDC*, el cual es expresado a partir de un promotor de clase 1, denominado así por su participación temprana en la síntesis flagelar. Los productos de los genes *flhD* y *flhC* forman un complejo heteromultimérico cuya función es activar a los promotores de clase 2 y que también actúa como represor de los promotores de clase 1 (Kutsukake, 1997). Los promotores de clase 2 son los encargados de dirigir la transcripción de los genes medios y el posterior ensamblaje de las proteínas codificadas por dichos genes da lugar a la formación de una estructura denominada gancho-corpúsculo basal (HBB, "Hook-Basal Body"). Los promotores de clase 2 también dirigen la transcripción de los genes *flgK*, *flgL* y *fliC*, cuyos productos se ensamblan inmediatamente después del HBB, y de dos genes reguladores, *fliA* y *flgM* (Gillen and Hughes, 1993; Ikebe *et al.*, 1999). El gen *fliA* codifica para un factor de transcripción que activa la transcripción de los promotores de clase 3. Tras completarse el HBB se produce la transcripción de los genes tardíos entre los que se encuentran *flgK*, *flgL*, *fliD*, *flgM* y los genes *fliC* o *fliB* que codifican las dos flagelinas alternativas (H1 y H2). La flagelina constituye el filamento y presenta actividad antigénica (ver apartado 1.2.2). Una vez ensamblado el filamento, se transcriben los operones *motA* y *tar* que codifican todas las proteínas responsables de la transducción de la señal quimiotáctica, las

proteínas del motor y los receptores transmembranales responsables de la motilidad flagelar. Los genes *motA* y *motB* son indispensables para el movimiento bacteriano ya que sus productos están implicados en la rotación. Además, se han identificado una serie de genes flagelares en *Salmonella* que no se encuentran en *Escherichia coli* (Frye *et al.*, 2006).

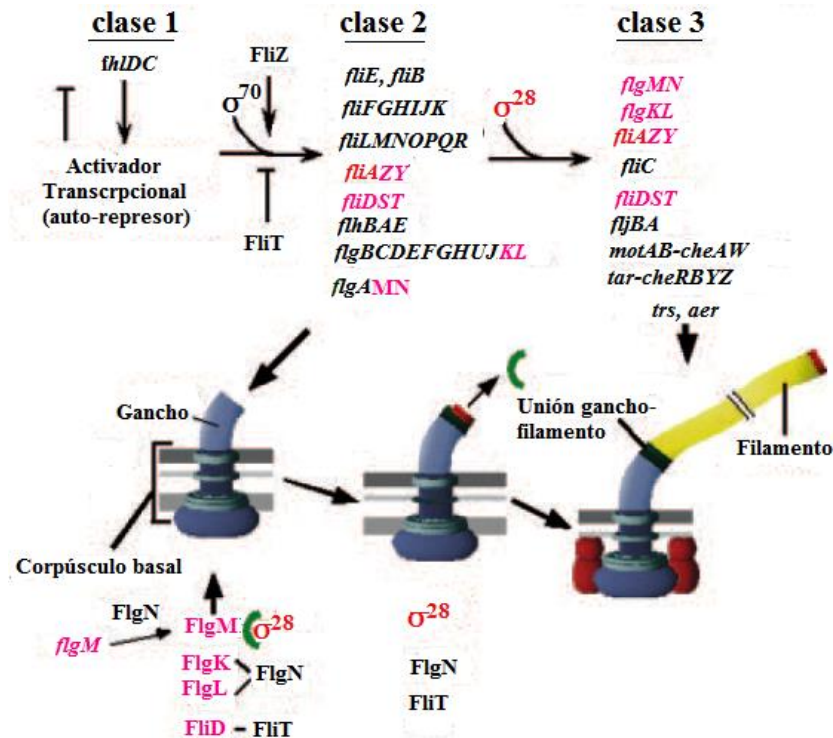


Figura 8. Regulación transcripcional del ensamblaje flagelar (Modificado de Frye *et al.*, 2006). Los genes indicados en rojo y fucsia son transcritos tanto a partir de promotores de clase 2 como de clase 3.

1.4.2. Fimbrias

Las fimbrias también conocidas como pili, son estructuras filamentosas no flagelares. Se encuentran distribuidas en la superficie bacteriana y están formadas por monómeros polimerizados de la proteína pilina. Estas estructuras están implicadas en múltiples funciones, como son la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente y en el hospedador, el desarrollo de biofilms, la movilidad (en el caso de los pili de tipo IV, que actúan mediante un mecanismo distinto al flagelar), la adherencia (permitiendo la unión de las bacterias a células u otros componentes del hospedador), la colonización, la invasión y la transferencia genética por conjugación (Gibson *et al.*, 2017; Yue *et al.*, 2012). En 2007 se habían identificado 15 tipos de fimbrias en *S. enterica* (Nuccio and Bäumlner, 2007), mientras que en 2011 este número se elevó a 35 (Tabla 2; Yue *et al.*, 2012). Los operones *bcf*, *fim*, *stb*, *sth*, *std*, *saf* y *sti* están presentes en la mayoría de las cepas y serotipos de *Salmonella* (80%), siendo el operón *bcf* el más conservado en todos ellos. Los operones *stf*, *lpf*, *ste*, *stc* y *stj* se encuentran parcialmente conservados y su distribución varía entre serotipos (presentes en el 40-80% de ellos). Más de la

mitad de los operones se identificaron en unos pocos o incluso en una única especie, subespecie o serotipo. Como ejemplo de ello, los operones *sba*, *sbb*, *sbc* sólo se identificaron en *S. bongori*; los operones *sdc* y *sdd* en *S. enterica* subsp. *arizonae*; *sdi*, *sdj*, *sdk* y *sdl* en la subespecie *diarizonae*; *mrk* en el serotipo Montevideo y *sde* en el serotipo Tennessee. El operón *pef* se encontró únicamente en el serotipo Typhimurium y en otros pocos más como Choleraesuis, Paratyphi C, así como en la variante monofásica 4,[5],12:i:- de Typhimurium (Yue *et al.*; 2012).

Tabla 2. Distribución de los diferentes operones fimbriales identificados en *Salmonella*.

Especie	Subespecie	Clase ¹	Operones fimbriales			
			Core	Conservados	Accesorios	Ausentes
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i> (I)	IA	<i>bcf, csg,</i>	<i>sti, saq, ste,</i>	<i>pef, stj, stc</i>	<i>ste</i>
		IB	<i>fim, sth,</i>	<i>stf, lpf</i>	<i>fae, sef, stc</i>	<i>ste</i> ²
		IC	<i>stb, std</i>		<i>pef, tcf</i>	
		ID	<i>stc-peg</i>		<i>sef, sta</i> ³ , <i>stg, sti, lpf, stj, tcf, pil, stc</i>	
		IE			<i>fae, mrk</i> ⁴ , <i>peh</i> ⁴ , <i>lpf, ste, stj, stk, pil, tcf</i>	
	<i>salamae</i> (II)			<i>stb, sdd, ssf</i> ⁷ , <i>std</i>	<i>sbs</i> ⁷	
<i>S. enterica</i>	<i>arizonae</i> (IIIa)			<i>sdc</i> ⁸ , <i>sdd</i>	<i>sth, stb, std</i>	
		<i>diarizonae</i> (IIIb)		<i>sdi</i> ⁹ , <i>stb, sdj</i> ⁹ , <i>sth</i>		
	<i>houtenae</i> (IV)		<i>sbc, sdd</i>	<i>bcf, stb</i>		
	<i>indica</i> (VI)		<i>sbc, sdk, sib</i> ¹⁰	<i>std</i>		
<i>S. bongori</i>	(V)		<i>csg, peg, lpf</i>	<i>sba</i> ¹¹ , <i>sbb</i> ¹¹ , <i>fim, stb, std</i>	<i>sbc, sbe, stg</i> <i>(sbd), pef, pil</i>	

¹ Filogenéticamente, la subsp. I se ha subdividido en cinco clases. La clase IA incluye una amplia gama de serotipos causantes de gastroenteritis, cuyo miembro principal es Typhimurium. La clase IB comprende los serotipos Dublin, Enteritidis, Pullorum y Gallinarum. La clase IC está formado por los serotipos Choleraesuis y Paratyphi C. La clase ID contiene los serotipos altamente adaptados a seres humanos: Typhi y Paratyphi A. Por último, los serotipos Virchow, Heidelberg, Hadar, Montevideo, Schwaarzengrund, Welteveden, Javiana, Kentucky y Tennessee forman la clase IE, rama separada y relacionada con IA (Yue *et al.*, 2012); ² ausente en la clase IA y en algunos serotipos de la IE; ³ exclusivo de la clase ID; ⁴ exclusivo del serotipo Montevideo; ⁵ exclusivo del serotipo Tennessee; ⁶ exclusivo de la clase IE; ⁷ exclusivo de la subsp. *salamae*; ⁸ exclusivo de la subsp. *arizonae*; ⁹ exclusivo de la subsp. *diarizonae*; ¹⁰ exclusivo de la subsp. *indica*; ¹¹ exclusivo de la especie *S. bongori*.

Hasta la fecha, se han identificado un total de 13 operones fimbriales en *Typhimurium*. (Weening *et al.*, 2005; Nuccio and Baümle, 2007; Nuccio *et al.*, 2011). Los genes codificadores de fimbrias están localizados en los operones *csg/agf*, *fim*, *lpf* (“long polar fimbriae”), *bcf* (“bovine colonization factor”), *stb*, *stc*, *std*, *stf* (*Salmonella Typhimurium* fimbriae), *sth*, *sti*, *saf* (“*Salmonella* atypical fimbriae”, codificadas por la SPI-6; ver apartado 1.4.3), *stj* y *pef* (plasmid-encoded fimbriae). Todos estos operones están localizados en el cromosoma a excepción del operón *pef* que es de localización plasmídica.

El operón *lpf* media la unión de la bacteria a las placas de Peyer y comprende los genes *lpfABCDE*. Este operón experimenta variaciones en su expresión como respuesta a la producción de anticuerpos específicos por parte del hospedador (Fierer and Guiney, 2001; Kingsley and Baümle., 2002).

Los operones *csgDEFG* y *csgAB* (*agf*) se encuentran en casi todos los serotipos y codifican un grupo de fimbrias denominadas “Curly” o “Tafi” (“Thin aggregative fimbriae”). Están implicadas en la adhesión de la bacteria a la fibronectina de la matriz extracelular, e involucradas en la formación de biofilms.

Otro tipo de fimbrias presentes en el género *Salmonella* son las fimbrias de tipo I, entre las que se encuentra el operón *fimAICDHF* y el operón plasmídico *pefABCDI*, que median la adhesión a residuos de manosa y células del epitelio intestinal en ratones, respectivamente.

Las fimbrias suponen una ventaja a la hora de evadir las defensas del hospedador, ya que las bacterias pueden controlar la composición de sus proteínas inmunogénicas (Edwards *et al.*, 2002). Sin embargo, no están implicadas exclusivamente en virulencia, puesto que también se encuentran en cepas no virulentas.

1.4.3. Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs, “*Salmonella* Pathogenicity Island”) son largas agrupaciones de genes que contribuyen a un determinado fenotipo de virulencia, el cual, generalmente se manifiesta en momentos claves del proceso infeccioso. Han sido adquiridas mediante transferencia horizontal a partir de fagos y/o plásmidos o son de origen desconocido. Forman parte del genoma accesorio de bacterias patógenas, pero no están presentes en el de bacterias no patógenas de la misma especie o de especies relacionadas. La adquisición de una SPI puede convertir una bacteria no patógena en patógena, dando lugar a la emergencia de nuevos patógenos como resultado de la evolución de cepas no virulentas. Por norma general, estas regiones comparten una serie de características comunes: Presentan un contenido de guanina-citosina (GC) menor (37-47%) que el resto del cromosoma bacteriano (50-53%); a menudo se encuentran insertadas en genes que codifican un ARNt; están asociadas a elementos genéticos móviles (EGMs), como secuencias de inserción (IS) completas o defectivas; contienen

genes que codifican proteínas implicadas en movilidad del ADN, como integrasas, resolvasas o transposasas, o se encuentran flanqueadas por repeticiones directas. Además, portan genes de virulencia (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt and Hensel, 2004).

En *Salmonella*, la mayoría de los genes de virulencia se localizan en SPIs. Hasta la fecha se han identificado un total de 24, cuya distribución es altamente variable (Tabla 3; Kingsley *et al.*, 2003; Hensel, 2004; Blondel *et al.*, 2009; Haneda *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2013; Hawyard *et al.*, 2013). Cinco de ellas (SPI-1 a SPI-5) son comunes a todos los serotipos de *S. enterica*. Algunos autores describen otras regiones cromosómicas con el término SPI, pero su implicación en virulencia no está del todo clara (López *et al.*, 2012).

Tabla 3. Características y distribución de las SPIs identificadas en *Salmonella*.

SPI	Tamaño (Kb)	%GC	Lugar de inserción	Distribución	Funciones de virulencia
SPI-1	39,8	47	<i>fthA-mutS</i>	<i>Salmonella</i>	Infección intestinal (SST3-1) y captación de hierro (<i>sif</i>)
SPI-2	39,7	44,6	ARNt ^{valV}	<i>S. enterica</i>	Supervivencia y replicación en los macrófagos (SST3-2)
SPI-3	17,3	47,3	ARNt ^{selC}	<i>Salmonella</i>	Captación de Mg ²⁺
SPI-4	23,4	44,8	<i>ssb-soxSR</i>	<i>Salmonella</i>	SST1, adhesión, invasión intestinal
SPI-5	7,6	43,6	ARNt ^{serT}	<i>Salmonella</i>	Proteínas efectoras de SST3-2
SPI-6	47	51,5	ARNt ^{aspV}	Subsp. I	Fimbrias <i>saf</i> , adhesión, invasión
SPI-7	134	49,7	ARNt ^{pheU}	Typhi, Paratyphi C, Dublin	Antígeno Vi, <i>sopE</i> , ensamblaje de pili tipo IVB
SPI-8	6,8	38,1	ARNt ^{pheV}	Typhi	Desconocido
SPI-9	16,3	56,7	Profago	Subsp. I	Desconocido. Posible toxina.
SPI-10	32,8	46,6	ARNt ^{leuX}	Subsp. I	Fimbrias <i>sef</i>
SPI-11	variable	41,3	Profago	Subsp. I	Supervivencia en macrófagos. Toxina tifoidea
SPI-12	variable	49,9	ARNt ^{proL}	Subsp. I	Infección sistémica en ratones
SPI-13	variable	48	ARNt ^{pheV}	Serotipos Subsp. I	Internalización y supervivencia en macrófagos de aves
SPI-14	9	41	Transposón	Serotipos Subsp. I	Invasión del epitelio. Codifica un transportador de electrones
SPI-15	6,5	-	ARNt ^{glyU}	Typhi	Desconocida
SPI-16	4,5	-	ARNt ^{argU}	<i>Salmonella</i>	Seroconversión (glicosilación del antígeno O)
SPI-17	5	-	ARNt ^{argW}	<i>Salmonella</i>	Seroconversión (glicosilación del antígeno O)
SPI-18	2,3	39,8	-	Typhi	Invasión del epitelio intestinal
SPI-19	~45	54,3	STM1133-ΔARNt ^{serX}	Subsp. I	SST6. Desconocida
SPI-20	~34	53,1	ARNt ^{aspV}	62:z4,z23:-.	SST6. Desconocida
SPI-21	~55	49,6	Transposasa	62:z4,z23:-.	SST6. Desconocida
SPI-22	20	-	ARNt ^{valV}	<i>S. bongori</i>	SST6, Desconocida
SPI-23	37	38	ARNt ^{leu}	Derby	Invasión del yeyuno en cerdos
SPI-24	25	43,9	<i>xseA-yfgJ</i>	Subsp. I	Colonización del epitelio intestinal en ratones

SPI-1. Está presente en *S. bongori* y todas las subespecies de *S. enterica*, lo cual sugiere que su adquisición representa un evento evolutivo fundamental en la divergencia con el género *Escherichia* (Baümle *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de estar altamente conservada, se ha descrito su ausencia en los serotipos Seftenberg y Litchfield (Hayward *et al.*, 2013). Se trata de una inserción de ADN de 39,8 Kb formada por un conjunto de al menos 29 genes, con un contenido en GC más bajo que el resto del genoma de *Salmonella* (52%, aproximadamente). No se encuentra asociada a ningún gen de ARNt, sino que aparece flanqueada por los genes *fhIA* y *mutS*. Tampoco contiene genes implicados en la movilidad del ADN. Esta isla es indispensable para que la infección intestinal tenga lugar e interviene en los procesos de patogenicidad intestinal tales como inflamación del epitelio y síntomas diarreicos (Marcus *et al.*, 2000; Wallis and Galyov, 2000; Zhou and Galán, 2001). Contiene genes que codifican los componentes estructurales de un sistema de secreción de tipo 3, denominado SST3-1 (*invA*, *invH* y *prgH*), sus reguladores (*hilA*) y varias proteínas efectoras que serán traslocadas a través de este sistema al interior de la célula epitelial (*spt*, genes *sip*). Lleva, además, los genes *sitABCD*, que codifican un sistema de captación de hierro. La invasión de las células no fagocíticas por *Salmonella* está mediada por un proceso que implica la modificación del citoesqueleto de actina por interacción directa de proteínas codificadas por SPI-1 (SipA y SipC), o a través de la activación de GTPasas de la familia Rho (por SopE, SopE2 y SopB/SigD). Esto provoca la internalización de la bacteria en la vesícula membranosa (SCV) mediante macropinocitosis. La activación de las GTPasas por parte de proteínas efectoras traslocadas por SST3-1 provoca, además, la alteración de las estrechas uniones entre las células epiteliales y su actuación sobre MAPK (“Mitogen Activated Protein Kinases”), pone en marcha la transcripción de factores nucleares y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

SPI2. Está presente en *S. enterica* y parte de ella también en *S. bongori* (Marcus *et al.*, 2000; Hensel 2004). Es una inserción de ADN de 39,7 Kb asociada al gen ARNt^{valV}. Contiene más de 40 genes, los cuales codifican un sistema regulador de dos componentes y un sistema de secreción de tipo 3 (SST3-2), que es estructural y funcionalmente distinto al codificado por la SPI-1. Está dividida en dos segmentos adquiridos en eventos evolutivos de transferencia horizontal diferentes. El fragmento más pequeño (14,5 Kb) presenta un contenido de GC del 54% y se localiza después del gen *ssrB* hasta el borde de la SPI-2. Contiene un grupo de cinco genes *ttr* implicados en la respiración anaerobia (reducción del tetrionato), y siete *orfs* de función desconocida. Se trata de la adquisición más antigua debido a su presencia en *S. bongori*. El fragmento más grande (25,3 Kb), con un contenido GC del 43%, contiene genes implicados en virulencia y está localizado entre el gen ARNt^{valV} y *ssrB* del genoma de Typhimurium. Está restringido a *S. enterica*, lo que podría indicar que su adquisición ha sido más reciente. En este fragmento se han descrito diversos genes agrupados en cuatro operones diferentes: *ssa* que

codifica el SST3-2, el cual se activa cuando la bacteria se encuentra en el interior de una célula hospedadora, translocando proteínas efectoras a través de la membrana de la SVC; el operón *ssr* que codifica proteínas efectoras translocadas por SST3-2; el operón *ssc*, que está implicado en la secreción de chaperonas y el operón *sse* que participa en la expresión de efectores del sistema de secreción. SPI-2 está implicada en la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir en el interior de los macrófagos y multiplicarse en el interior de las SVCs en fagocitos y otras células eucariotas, por lo que es indispensable tanto para la infección intestinal como para la sistémica (Schmidt and Hensel, 2004).

SPI-3. Es un segmento de 17,3 Kb con un contenido GC del 47,5%, insertado en el gen *ARNt^{selC}*. Contiene un total de diez *orfs* organizadas en seis unidades transcripcionales. Su principal función de virulencia está asociada al operón *mgtCB*, el cual codifica para un sistema de captación de Mg^{2+} , necesario para el crecimiento de la bacteria en condiciones limitantes de este elemento, como las que existen en el interior de las SVCs. Este operón está regulado por los genes *phoP/Q* localizados en una isleta cromosómica y que codifican un sistema regulador de dos componentes (Blanc-Potard *et al.*, 1997; Schmidt and Hensel, 2004). Otras proteínas codificadas por la SPI-3 son MarT y MisL, las cuales podrían estar implicadas en procesos de patogenicidad como la infección crónica y la especificidad del hospedador (Marcus *et al.*, 2000; Hensel, 2004). El análisis de la SPI-3 en *S. bongori* y *S. enterica* pone de manifiesto la presencia de variaciones estructurales como deleciones y/o inserciones de genes individuales o grupos de genes mayoritariamente adyacentes al gen *ARNt^{selC}*. Sin embargo, el operón *mgtCB* y los genes *marT* y *misL* están conservados (Blanc-Potard *et al.*, 1999).

SPI-4. Es una región de 23,4 Kb con una estructura en mosaico flanqueada por el gen *ssb* que codifica una proteína de unión a ADN de cadena sencilla, y los genes *soxSR* implicados en la regulación de la respuesta a superóxido. Sus *orfs* tienen un bajo contenido en GC respecto al resto del cromosoma, mientras que en las regiones intergénicas su contenido es mayor. Contiene unas dieciocho *orfs* que podrían codificar un sistema de secreción de tipo 1 (SST1) implicado en la secreción de toxinas. Además, presenta genes implicados en la supervivencia en los macrófagos. Dada la capacidad de *Typhimurium* para inducir la apoptosis de los macrófagos infectados, se cree que SST1 podría mediar la secreción de una citotoxina (Marcus *et al.*, 2000; Schmidt and Hensel, 2004). Los genes *siiCDF* regulan el ensamblaje del sistema de secreción, el cual es responsable de la secreción de SiiE, una adhesina gigante implicada en la interacción de *Salmonella* con las células del epitelio intestinal humano. La expresión de este operón está regulada por la proteína HilA, codificada por la SPI-1, lo cual sugiere que estas islas desempeñan funciones complementarias durante la invasión intestinal (Main-Hester *et al.*, 2008).

SPI-5. Es un pequeño locus de tan solo 7,6 Kb con un contenido GC del 43,6%, que está flanqueado por los genes *ARNt^{SerT}* y *copS/copR*. Codifica una serie de proteínas efectoras entre las que se encuentra SopB, la cual es translocada al citosol de las células del hospedador por el SST3-1, donde participa en la inducción de la inflamación y de la secreción de lípidos en la mucosa intestinal. Otro efector codificado por esta isla es PipB, introducido en la célula hospedadora por SST3-2. La expresión del gen *pipB* se encuentra controlada por el sistema de dos componentes SsrAB, codificado por SPI-2 (Hensel, 2004). Esta isla se encuentra altamente conservada en la región *sopB*, mientras que *pipB* está ausente en *S. bongori* y en *S. enterica subsp. salamae*, lo cual sugiere que ambas regiones fueron adquiridas en procesos evolutivos independientes (Hensel, 2004).

Además de estas 5 SPIs presentes en todas las especies y subespecies del género *Salmonella*, existen otras muchas con distribución variable, de las que SPI-7, SPI-8 y SPI-9 están asociadas característicamente a los serotipos tifoideos.

SPI-6. También conocida como CSI (“*Salmonella enterica* Centisome 7 genomic Island”). Está insertada entre los genes *ARNt^{aspV}* y *yafV*, tiene 47 Kb y un total de 37 genes, incluyendo el operón de fimbrias *saf* y el regulador transcripcional *sinR* (Fokelsson *et al.*, 1999). Codifica, además, un sistema de secreción tipo 6 (SST6) y contiene el operón *sciA-Z* que codifica una serie de proteínas homólogas a proteínas asociadas a virulencia en otras bacterias Gram negativas, como los *E. coli* enterohemorrágicos. Estas proteínas se localizan en el citoplasma, en el interior y exterior de la membrana y en el espacio periplásmico y tienen la capacidad de interactuar y modificar las células eucariotas. En esta región también se encuentra el gen *pagN* involucrado en la adherencia e invasión de células eucariotas, además de otros genes de función desconocida (Hensel, 2004; Lambert and Smith, 2008). SPI-6 está restringida a cepas de *S. enterica subsp. enterica* y su delección afecta a la capacidad de la bacteria para entrar en las células del hospedador. La región donde se localizan el operón *saf* y los genes *sinR* y *pagN* tiene un contenido GC menor respecto al cromosoma (45%), mientras que en el resto de la isla el contenido GC es mayor (56%) (Folkesson *et al.*, 2002).

SPI-7, conocida como isla mayor de patogenicidad, es específica de los serotipos Typhi, Paratyphi C y algunas cepas de Dublin. Tiene un tamaño de 134 Kb y se encuentra insertada junto al *ARNt^{pheU}*. Presenta una estructura en mosaico y contiene genes implicados en su propia transmisión junto con genes que codifican factores de virulencia como el antígeno capsular o Vi (región *viaB*), el efector fágico SopE y *pili* de tipo IVB implicados en la invasión. SopE es una proteína efectora introducida por el SST3-1 en células epiteliales. Puede encontrarse también en otros serotipos de la subsp. I, lo cual indica que *sopE* se localiza en un profago funcional que puede activar y mediar su propia movilización (Schmidt and Hensel, 2004; Hensel, 2004).

SPI-8 está restringida a los serotipos Typhi y Paratyphi A. Es una región de ADN de 6,8 Kb asociada al tARN^{pheV} (Parkhill *et al.*, 2001). Codifica proteínas similares a bacteriocinas y una integrasa implicada en su movilidad. Es inestable, pudiendo liberarse eventualmente del cromosoma mediante recombinación homóloga debido a la presencia de secuencias repetidas en sus extremos (González, 2010).

SPI-9 es una región de 16,3 Kb flanqueada en Typhi por el genoma de un bacteriófago lisogénico que codifica un SST1 y por el gen de una toxina de gran tamaño de tipo RTX (“Repeats in ToXin”; cuyo miembro mejor caracterizado es la hemolisina HlyA de los *E. coli* uropatogénicos). Esta región también se ha detectado en Typhimurium, aunque la *orf* de la toxina de tipo RTX es un pseudogen. De forma incompleta también se encuentra en otros serotipos de *S. enterica* y en *S. bongori* (Velásquez, 2016).

SPI-10 ha sido identificada en Typhi, Paratyphi, Enteritidis, Dublin y Gallinarum. Consiste en una larga región de 32,8 Kb insertada en el gen ARNt^{leuX}. Contiene un profago completo, relacionado con P4 y denominado ST46, el operón fimbrial *sefA-R*, junto con otros genes asociados a virulencia, como *prpZ*, *prkY* y *prkX* (Parkhill *et al.*, 2001; Hensel, 2004).

SPI-11 es un fragmento de 14 Kb inicialmente descrito en Cholerasuis insertado junto al profago Gifsy-1 (Chiu *et al.*, 2005). Posteriormente, se ha identificado en Typhimurium y Typhi con tamaños de 6,7 y 10 Kb, respectivamente. Incluye los genes *sopB*, *mppA*, *icdA*, *envF*, *msgA*, *envE*, *pagD* y *pagC*, involucrados en la supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos, y el gen *cdtB* que codifica la toxina tifoidea (CDT, “Cytolethal Distending Toxin”), que daña el ADN interrumpiendo el ciclo celular (Miller *et al.*, 1989; Spanò *et al.*, 2008).

SPI-12 es un fragmento de ADN insertado junto al gen ARNt^{proL}, con un tamaño de 15,8 Kb en Typhimurium y 6,3 Kb en Typhi (Hanser-Wester and Hensel, 2002). En Typhimurium está asociada con la infección sistémica en ratones y contiene 11 *orfs* de genes fágicos, mientras que en Typhi incluye 4 genes de los cuales 3 son pseudogenes. En ambos serotipos contiene el gen *sspH2* (Miao *et al.*, 1999).

SPI-13 ha sido identificada en varios serotipos de *S. enterica*, como Enteritidis, Typhimurium, Cholerasuis y Gallinarum. Sin embargo, está ausente en Typhi y Paratyphi A. En Typhimurium es un fragmento de unas 25 Kb localizado junto al gen ARNt^{pheV}. Está implicada en la infección sistémica en ratones y en la supervivencia en el interior de los macrófagos (Shi *et al.*, 2006; Haneda *et al.*, 2009).

SPI-14 tiene un tamaño de 9 Kb y está presente en Typhimurium pero no en Typhi (Shah *et al.*, 2005). Esta isla contribuye a la virulencia de Typhimurium, afectando a la invasión mediante la expresión del gen *loiA*, el cual también influye en la expresión del gen *hilA* localizado en SPI-1 (Jiang *et al.*, 2017).

SPI-15 es una isla de 6,5 Kb insertada cerca del gen $ARNt^{glyU}$ identificada en el serotipo Typhi.

SPI-16 está presente en todos los linajes de *Salmonella* excepto *S. bongori* y *S. enterica* subsp. *arizonae*. Consiste en un fragmento de 4,5 Kb insertado junto al gen $ARNt^{argU}$. Los genes *gtrA* y *gtrB* de dicha isla presentan una identidad alta con genes del fago P22 y están implicados en la seroconversión (Mavris *et al.*, 1997; Guan *et al.*, 1999), por lo que sus productos podrían intervenir en la glicosilación del antígeno O, originando variaciones de la superficie celular (Bogomolnaya *et al.*, 2008).

SPI-17, presente en el serotipo Typhi, tiene un tamaño de 5 Kb y se localiza junto al gen $ARNt^{argW}$. Al igual que SPI-16 contiene genes homólogos a los genes responsables de la seroconversión por el fago P22. Estas tres últimas SPI, SPI-15, SPI-16 y SPI-17, han sido identificadas mediante herramientas bioinformáticas (Vernikos and Parkhill, 2006).

SPI-18 es una inserción de 2,3 Kb compuesta por los genes *hyle* y *taiA*, cuyos productos participan en la invasión del epitelio intestinal. Está presente en algunos genomas pertenecientes a los serotipos Paratyphi A, Javiana y Typhi. (Fuentes *et al.*, 2008).

SPI-19 se encuentra en diversos serotipos de *S. enterica* como Dublin, Weltevreden, Agona, Gallinarum y Enteritidis. Es una región de unos 45 Kb, aunque en Enteritidis una delección interna eliminó 24 Kb, aproximadamente. Está flanqueada en su extremo 3' por un grupo de genes de proteínas involucradas en el transporte y utilización de azúcares y en su extremo 5' por una versión delecionada del $ARNt^{SerX}$. Codifica un nuevo SST6, además del previamente descrito en SPI-6, y dos proteínas de tipo Hcp (“Hemolysin coregulated protein”), denominadas Hcp-1 y Hcp-2. Hcp-1 está codificada en un operón que incluye la mayoría de los genes del SST6, mientras que el gen de Hcp-2 se encuentra en el otro extremo de la isla (Blondel *et al.*, 2009).

SPI-20 y SPI-21 están restringidas a *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa) serotipo 62:z4,z23 y codifican dos nuevos SST6. **SPI-20** es una inserción de unas 34 Kb que contiene 28 *orfs* con un contenido GC de 53,1%. Esta isla codifica una proteína similar a Hcp (SARI_02729) y una proteína VgrG sin extremo C-terminal y está localizada en las inmediaciones del $ARNt^{aspV}$. Por su parte, **SPI-21** es una inserción de unos 55 Kb delimitada por remanentes de transposasas con un contenido GC del 49,6%. Se encuentra flanqueada por un profago insertado en el extremo 3' de gen *thrW*, sitio de integración de P22 (Kropinski *et al.*, 2007). En su extremo izquierdo se localiza una pequeña isla de ocho *orfs* homólogas a las contenidas en SPI-14 de Typhimurium. Consta de un total de 57 *orfs*, veinte de las cuales codifican componentes relacionados con el SST6 y VgrG. Además, incluye 4 *orfs* que codifican bacteriocinas cuya presencia, junto con VgrG, sugieren que las bacterias podrían usar el SST6 para matar otras bacterias (Blondel *et al.*,

2009). Hasta el momento, se han descrito en *S. enterica* cuatro SST6 distintos, codificados por las islas SPI-6, SPI-19, SPI-20 y SPI-21.

SPI-22 es una inserción de 20 Kb presente en *S. bongori* localizada en la posición de SPI-2 y que codifica un SST6. Codifica todos los componentes del SST6, incluidos los homólogos de DotU e IcmF, necesarios para la secreción y estabilización de la membrana y otras funciones esenciales asociadas al sistema de secreción incluyendo VgrG y Hcp (Fookes *et al.*, 2011).

SPI-23 es una inserción de 37 Kb localizada entre el gen *ARNt^{leu}* y el gen *docB*. Está presente en algunos serotipos de *S. enterica* como Derby, Agona, Dublin y Gallinarum. Contiene genes que codifican para un sistema de SST3 y para la producción de un tipo de pili. Esta isla juega un papel importante en la invasión del yeyuno de ganado porcino (Hayward *et al.*, 2013; 2014; 2016).

Finalmente, **SPI-24**, también conocida como CS54, es una región de 25 Kb localizada entre los genes *xseA* y *yfgJ* que contiene los genes *shdA*, *ratA*, *ratB*, *sivI* y *sivH*, todos ellos implicados en la colonización intestinal en ratones (Kingsley *et al.*, 2003). Esta isla se ha identificado en diversos serotipos de la subsp. I.

De todas las SPIs descritas hasta el momento, en Typhimurium se han detectado 12 (SPI-1-6, 9, 11-14 y 16), así como genes individuales pertenecientes a otras SPIs (Shah *et al.*, 2005; Sabbagh *et al.*, 2010; Hayward *et al.*, 2013).

1.4.4. Otros genes de virulencia

El genoma de *Salmonella* contiene otros genes de virulencia que aparecen de forma individual o se agrupan en *loci* de pequeño tamaño denominados islotes. Estos últimos no están asociados a EGM aunque si presentan un contenido GC inferior al resto del genoma, pudiendo haber sido adquiridas mediante transferencia horizontal. Entre los genes localizados en islotes se encuentran *sifA* implicado en la multiplicación de *Salmonella* en los macrófagos; *pagC*, *pagD* y *msgA*, que también participan en la multiplicación en los macrófagos; *iviVI* que está relacionado con la adhesión e invasión de los enterocitos; *ratB* y *sdhA* asociados a los síntomas diarreicos y la colonización del epitelio intestinal; así como genes codificadores de fimbrias (Gunn *et al.*, 1995; Groisman, 1998; Kingsley *et al.*, 2003; Eswarappa *et al.*, 2008). Entre los genes individuales destacan *stn*, que codifica para una enterotoxina (Prager *et al.*, 1995); genes implicados en la resistencia al estrés oxidativo y reguladores transcripcionales de distintos genes de virulencia (*phoP/Q*, *slyA*) (Eriksson *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 1999), así como genes que codifican la salmochelina (*iroBCDNE*) y otros sideróforos responsables de la captación de hierro por *Salmonella* (Carpenter and Paine, 2014). En la Tabla 4 se muestran los genes, junto con sus funciones, que son relevantes en este trabajo.

Tabla 4. Función de los genes asociados con virulencia en *Salmonella*.

Gen	Función
<i>misL</i>	Codifica una adhesina de autotransporte implicada en la colonización intestinal
<i>sinH</i>	Codifica un factor implicado en la colonización
<i>bapA</i>	Codifica un factor implicado en la colonización
<i>pagN</i>	Codifica un factor implicado en la invasión celular
<i>mig-5</i>	Codifica una anhidrasa carbónica inducido por los macrófagos
<i>mig-14</i>	Codifica una proteína necesaria para la proliferación bacteriana en el hígado y bazo en ratones
<i>phoP/Q</i>	Codifica un sistema regulador de dos componentes con efecto pleotrópico
<i>pipB2</i>	Promueve la extensión de la proteína Sif y recluta kinesina-1 para SCV
<i>sifA</i>	Codifica un factor requerido para la integridad de la membrana de SCV
<i>slrP</i>	Codifica una posible ubiquitin ligasa posiblemente implicada en la especificidad de hospedador
<i>sopA</i> y <i>sopD</i>	Reclutamiento de células del sistema inmune y secreción de fluidos en el lumen intestinal
<i>sopB</i>	Codifica una inositol polifosfato fosfatasa
<i>sopD2</i>	Codifica un efector que promueve la fisión de la membrana y la macropinocitosis
<i>ssel1/ssek2</i>	Codifican efectores requeridos durante la infección
<i>sspH2</i>	Reorganización del citoesqueleto

1.4.5. Plásmidos de virulencia

Los plásmidos son moléculas de ADN bicatenario extracromosómicas, generalmente circulares, con capacidad auto-replicativa que presentan un tamaño variable. Su estructura es modular y está constituida por un esqueleto conservado, común a todos los plásmidos relacionados e involucrado en su propia replicación, mantenimiento y/o transferencia. Además, pueden contener regiones variables con genes que pueden otorgar ventajas selectivas a la bacteria hospedadora como funciones metabólicas, genes de virulencia y/o genes resistencia. Los plásmidos se caracterizan por su plasticidad, ya que evolucionan rápidamente gracias a procesos de recombinación homóloga o sitio-específica y/o transposición (Bennett, 2004).

Los plásmidos pueden clasificarse en base a diversas características. Una primera clasificación divide a los plásmidos en grupos de Incompatibilidad (Inc; Couturier *et al.*, 1988), que dependen del modo de replicación y mantenimiento en la célula hospedadora. Cabe destacar que dos plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad son mutuamente excluyentes, siendo incapaces de propagarse en la misma línea celular. Sin embargo, es habitual detectar varios plásmidos compatibles en una misma bacteria (Bennet *et al.*, 2008). Hasta el momento, se han identificado un total de 28 grupos de incompatibilidad en plásmidos de Enterobacterias. Estos grupos difieren entre sí en cuanto a tamaño, rango de hospedador, capacidad y mecanismo de transferencia, así como por los genes de resistencia y/o virulencia que portan (Carattoli, 2009; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Algunos plásmidos pueden promover su propia transferencia a otras bacterias, relacionadas o no, mediante el proceso de conjugación y esta es la base de una segunda clasificación. Los

plásmidos que presentan esta capacidad de transferencia horizontal se denominan conjugativos. Existen, además, plásmidos movilizables, los cuales carecen de la maquinaria completa necesaria para su propia transferencia, pero pueden ser movilizados por plásmidos conjugativos capaces de suplir las funciones de las que carecen. Finalmente, también existen plásmidos no conjugativos ni movilizables.

De acuerdo con las funciones que aportan a la bacteria hospedadora, existen plásmidos de virulencia cuya presencia en *Salmonella* fue sugerida por primera vez en 1982 (Jones *et al.*, 1982). Sin embargo, solamente han sido identificados en siete serotipos no tifoideos pertenecientes a la subsp. *enterica*, entre ellos Enteritidis y Typhimurium. Estos plásmidos tienen un tamaño y contenido genético variable (Baümmler *et al.*, 1998), pero todos ellos comparten el locus *spv* (“*Salmonella* plasmid *virulence*”) que es importante para la multiplicación intracelular de la bacteria y, además, se ha relacionado con infecciones invasivas severas en seres humanos (Fierer and Guiney, 2001; Fuit, 2005; Fierer and Guiney, 2011). El locus *spv* consta de cinco genes (*spvRABCD*), regulados por las condiciones restrictivas que se dan en el interior de los macrófagos. Dependiendo del serotipo, los plásmidos de virulencia pueden contener otros genes implicados, por ejemplo, en la biosíntesis de fimbrias (operón *pefBACDI*) o en la resistencia al suero (*rck* y *rsk*). El plásmido de virulencia del serotipo Typhimurium tiene 94 Kb, contiene los replicones IncFIIA (IncFIIAs) e IncFIB y se denomina pSLT. Cabe destacar que los plásmidos IncF, a diferencia de los pertenecientes a otros grupos de incompatibilidad, suelen portar más de un replicón.

1.4.6. Profagos

Los profagos representan la mayor fuente de diversidad genética encontrada en los genomas bacterianos (Brüssow *et al.*, 2004). Son genomas de origen fágico, es decir de virus que infectan a bacterias, y que en su mayoría se encuentran integrados en el cromosoma de estas, aunque algunos se establecen en plásmidos. En *Salmonella*, al igual que en otras bacterias, los profagos constituyen una parte importante del genoma accesorio y su inserción tiene lugar en sitios específicos, como los genes que codifican ARNts (Delesalle *et al.*, 2016). Ya sean funcionales o defectuosos, pueden recombinarse con otros genomas fágicos y / o profagos, lo cual constituye un evento esencial en la evolución de los bacteriófagos (Hendrix *et al.*, 1999). Su contribución a la virulencia de *S. enterica* ha sido reconocida recientemente, dado que pueden aportar genes que no están implicados en sus propias funciones, pero que pueden beneficiar a su hospedador, como genes que codifican resistencia a antimicrobianos o factores de virulencia (Bernheim and Sorek, 2018), un ejemplo de ello se muestra en la Tabla 5. El genoma de *Salmonella* contiene varios profagos similares a lambda, Mu y a bacteriófagos de las familias P2 y P4 (Ehrbar and Hardt, 2005). Las cepas de Typhimurium pueden poseer un conjunto distinto de profagos, al

menos 16, los cuales contienen genes de virulencia que codifican efectores que son translocados al interior de las células eucariotas mediante SST3-1 y SST3-2. Entre ellos, los profagos Gifsy-1, Gifsy-2, Fels-1 y Fels2 se han identificado en el genoma de Typhimurium LT2 (McClelland *et al.*, 2001; Brüßow *et al.*, 2004). Las cepas Typhimurium ATCC14028 y SL1344 contienen los profagos Gifsy-3 y SopE, respectivamente, además de Gifsy-1 y Gifsy-2 que son comunes a todas ellas (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001; Brüßow *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2004).

La naturaleza modular de los profagos contribuye significativamente a la variación observada entre serotipos y, además, constituye la mayor fuente de variabilidad genética entre cepas del mismo serotipo (Boyd *et al.*, 2003; Vernikos *et al.*, 2007; Rabsch *et al.*, 2011).

Tabla 5. Genes fágicos y su papel en la virulencia de *Salmonella*.

Gen	Función	Profago
<i>sodCI</i>	Codifica una superóxido dismutasa Cu/Zn periplasmática	profago lamboide
<i>gvrA</i>	Codifica un factor de antivirulencia	Gifsy-2
<i>sfrH/ssel</i>	Codifica un activador del efector SsrB	gifsy-2
<i>sopE</i>	Codifica un efector que induce la desestabilización de la membrana y la respuesta proinflamatoria	Bacteriofago sopEΦ y mTmV
<i>sopE2</i>	Codifica una proteína homóloga a sopE	
<i>gipA</i>	Codifica un factor de virulencia específico de las placas de Peyer	Gifsy-1
<i>sodCIII</i>	Codifica una posible superóxido dismutasa de Cu/Zn	Fels-1
<i>gogB</i>	Codifica un efector antiinflamatorio que ayuda a regular la colonización al limitar el daño tisular durante la infección	Gifsy-1

1.5. La pandemia silenciosa: Resistencia a antibióticos

El descubrimiento de la penicilina, por Alexander Fleming en 1928, y de otros antibióticos, junto con su utilización terapéutica constituye uno de los hitos más importantes de la medicina en el siglo XX. El uso de estas sustancias ha reducido considerablemente la morbilidad y mortalidad en seres humanos y animales. Sin embargo, al inicio de la era antibiótica se desconocía la capacidad de las bacterias para adquirir mecanismos de resistencia frente a los antibióticos, aunque la alarma sobre el uso abusivo de los antibióticos ya había sido indicada por Fleming. Fue en los años 50 cuando aparecieron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina (Levy and Marshall, 2004). Varios estudios epidemiológicos han relacionado la emergencia y dispersión de bacterias resistentes directamente con el uso terapéutico y profiláctico de antibióticos en animales y humanos (Ventola, 2005). Sin embargo, esta no es la única causa responsable de dicho aumento, sino que se han identificado otras como son el uso de concentraciones sub-óptimas en el tratamiento de infecciones humanas, así como el uso abusivo y desmesurado en ganadería, acuicultura y agricultura. Cabe destacar que la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento animal, prohibida a partir de 2006 en la Unión Europea, constituye una de las causas más importantes en la emergencia de cepas

resistentes. Todo ello ha favorecido que las variantes resistentes se hayan vuelto predominantes en diferentes entornos, por la presión selectiva de los antibióticos sobre las bacterias sensibles. Finalmente, el aumento de viajes nacionales e internacionales, junto con la globalización del comercio, ha contribuido a la dispersión de las bacterias resistentes, dando lugar a un grave problema sanitario a nivel mundial (Cantas *et al.*, 2013). Este hecho, agravado por la disminución en el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, ha llevado a la elaboración y aprobación en la 68ª asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS), celebrada en 2015, de un “Plan de acción global frente a la resistencia a los antibióticos”, así como a la instauración de un plan de vigilancia cuyo objetivo es garantizar la continuidad de la prevención y el tratamiento satisfactorio de las enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros y de calidad garantizada, que se usen de modo responsable y sean accesibles a todas las personas que los necesiten (WHO, 2017).

El problema de la resistencia y su incremento a nivel mundial está bien estudiado, siendo España uno de los países desarrollados con mayor prevalencia y con mayor consumo de antibióticos (ECDC, 2020). Como se ha indicado anteriormente, en el caso de *Salmonella* el tratamiento con agentes antibióticos no es necesario en infecciones intestinales leves. Sin embargo, su uso es necesario en el caso de infecciones invasivas y en pacientes con factores de riesgo reconocidos, siendo los antibióticos de elección más frecuentes la ampicilina, el cloranfenicol y el cotrimoxazol (trimetoprim-sulfametoxazol). La emergencia de cepas con resistencia simultánea a múltiples antibióticos (multirresistentes o MDR) ha hecho necesario recurrir a nuevos agentes como las fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y las cefalosporinas de amplio espectro, frente a las cuales también están apareciendo resistencias (Parry and Threlfall, 2008). De forma general podemos clasificar la resistencia en dos grandes grupos (Cantón *et al.*, 2003; Alekshun and Levy, 2007):

La **resistencia intrínseca o innata**, es específica de un determinado grupo, género o especie bacteriana y, por tanto, es natural y transferida de forma vertical a todos los miembros de dicho grupo.

La **resistencia adquirida**, se debe a la alteración de la estructura o fisiología de las células bacterianas. Esta variación se consigue bien por mutación de un gen cromosómico cuya transferencia es vertical, esto es, de una bacteria a sus descendientes, u horizontal, entre bacterias más o menos relacionadas, presentes en un mismo nicho. Esta última, conocida como **resistencia transferible**, es la principal responsable de la resistencia y multirresistencia a antibióticos y está mediada principalmente por EGM.

1.5.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Los antibióticos son moléculas de origen natural (antibióticos), sintético o semisintético, capaces de inhibir el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos) o ejercer una acción letal para las bacterias (bactericidas). Estas sustancias actúan inhibiendo diversos procesos metabólicos que son esenciales para la supervivencia bacteriana. En general pueden interferir en la síntesis de la pared celular, como los β -lactámicos y la fosfomicina; inhibir la síntesis de proteínas como los aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos; interferir con la síntesis de ADN y ARN, como las quinolonas o la rifampicina; mientras que otros pueden actuar bloqueando alguna etapa de una ruta metabólica como las sulfonamidas y el trimetoprim (Van Hoek *et al.*, 2011). Sin embargo, las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos que impiden la actuación de los antibióticos, los cuales se detallan a continuación (Figura 9; Spratt, 1994; McDermott *et al.*, 2003; Magnet and Blanchard, 2005; Wright, 2005).

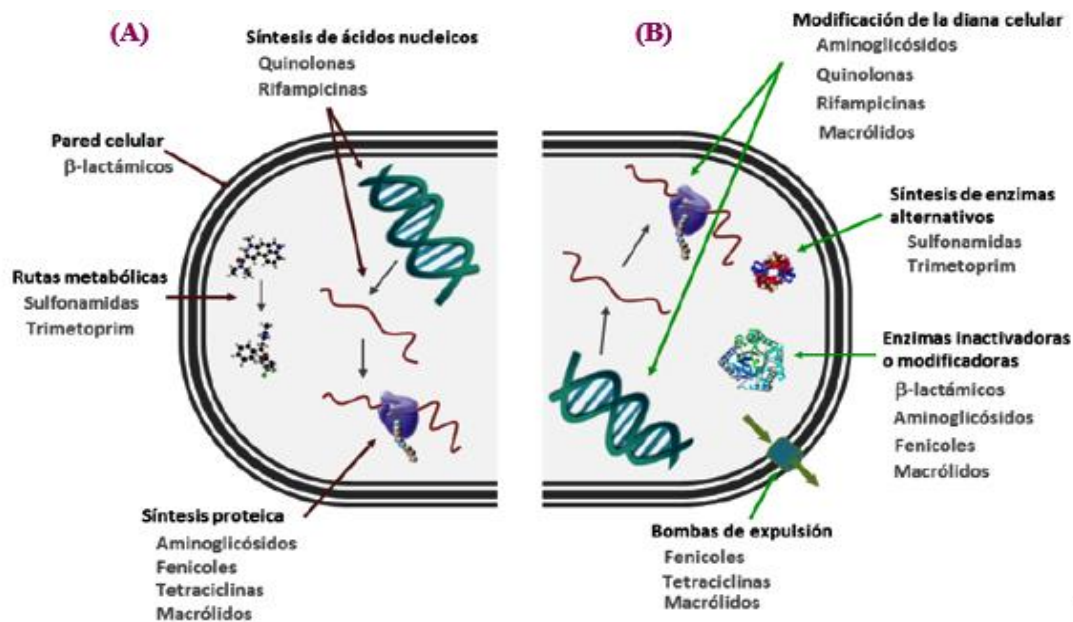


Figura 9. Mecanismo de actuación de agentes antibióticos y de resistencia de los mismos (P. García, 2013; Tesis Doctoral).

(A) Dianas bacterianas.

(B) Mecanismos de resistencia más frecuentemente desarrollados por las bacterias.

1.5.1.1. Inhibición de la biosíntesis de la pared bacteriana

Los **β -lactámicos** constituyen la familia de antibióticos más utilizada en clínica, por su amplio espectro de acción y su baja toxicidad. Son de origen natural o semisintético y se caracterizan por poseer un anillo β -lactámico en su molécula. Se pueden clasificar en subfamilias en base a su estructura química (Rotger-Anglada, 2000; Avendaño *et al.*, 2001; García-Rodríguez, 2006), que incluyen a las penicilinas como la ampicilina y amoxicilina;

cefalosporinas, tradicionalmente clasificadas en función de su espectro de actuación en cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación (Duplessis and Crum-Cianflone, 2011); monobactamas, carbapenemas e inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico y el tazobactam. Son agentes bactericidas que actúan sobre la síntesis del peptidoglicano, que forma parte de la pared celular bacteriana. Actúan durante la última etapa, inhibiendo el entrecruzamiento de los péptidos pertenecientes a los polímeros lineales recién sintetizados y el peptidoglicano preexistente en la pared celular, debilitándola y originando la muerte de las bacterias por lisis osmótica. Existen múltiples mecanismos de resistencia bacteriana a los β -lactámicos como: (1) la alteración de enzimas implicadas en la síntesis del peptidoglicano conocidas en su conjunto como proteínas de unión a penicilinas (PBPs, “Penicilin Bindig Proteins”); (2) la alteración de la permeabilidad debida a la pérdida o modificación de porinas, limitando así la entrada del antibiótico; (3) la expresión de bombas de expulsión y (4) la producción de β -lactamasas, enzimas inactivantes con capacidad para hidrolizar el anillo β -lactámico, que constituyen el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos descrito en bacterias. Los genes responsables (*bla*) pueden localizarse en el cromosoma y/o en plásmidos. Codifican distintos subgrupos de β -lactamasas (TEM, OXA, CTX, FOX, CMY, VIM, KPC, etc.), que se diferencian en base a sus características estructurales y funcionales. Destacan las β -lactamasas de espectro extendido o ampliado (BLEE/BLEA), las β -lactamasas de tipo AmpC y las carbapenemasas. Las BLEE incluyen a todas aquellas β -lactamasas pertenecientes al grupo funcional 2e de la antigua clasificación de Bush y las clases A, B y D de la clasificación de Ambler (Livemore, 2008), como son las de tipo CTX-M, VEB, SHV y la mayoría de las TEM. Sin embargo, esta definición es incompleta por lo que actualmente se consideran BLEEs a los enzimas pertenecientes a los grupos 2be y 2de de la última clasificación de Bush (Bush and Jacoby, 2010). Las AmpC incluyen las β -lactamasas pertenecientes al grupo 1, entre ellas las de tipo LAT, MIR, CMY y FOX. Por último, las carbapenemasas incluyen todas aquellas β -lactamasas pertenecientes a los grupos 2f, 2d y 3 de la clasificación de Ambler como son las de tipo VIM, IMP, IMI, KPC, NDM y OXA. Muchos de los genes asociados con la producción de β -lactamasas están asociados a EGM como plásmidos, transposones y secuencias de inserción (ver apartado 1.5.4.2). Entre los plásmidos portadores de estos genes destacan los pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncFII, IncFIA, IncFIB, IncHI2, IncI, IncA/C, IncN, IncL/M o IncC (Cantón and Coque, 2006; Carattoli *et al.*, 2006; Hopkins *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2013).

La **fosfomicina** es un antibiótico de amplio espectro derivado del ácido fosfónico. Penetra en el interior de las bacterias a través de permeasas donde se une de forma irreversible al enzima piruviltransferasa, encargada de una de las primeras etapas de la biosíntesis del peptidoglicano.

Los genes de resistencia a fosfomicina están localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos y codifican tres enzimas denominadas FosA, FosB y FosX (Rigsby, *et al.*, 2005).

1.5.1.2. Inhibición de la síntesis proteica

Los **aminoglicósidos** son sustancias naturales o sintéticas con capacidad bactericida y de amplio espectro que inhiben la síntesis de proteínas gracias a su unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Se clasifican en cuatro familias en base a sus aminoazúcares: Estreptomina, Kanamicina (incluye los antibióticos kanamicina, amikacina, tobramicina y dibekacina), Gentamicina (gentamicina y netilmicina) y Neomicina (Quintiliani *et al.*, 2004). Los principales mecanismos implicados en la resistencia a estos compuestos son: 1) disminución de la acumulación intracelular del aminoglicósido debido a alteraciones en la permeabilidad de la membrana bacteriana y/o la actuación de bombas de expulsión (Mingeot-Leclercq and Tulkens, 1999); 2) cambios en los sitios de unión de los aminoglicósidos a los ribosomas mediante la metilación de secuencias conservadas del ARN ribosómico (ARNr) 16S (genes plasmídicos *armA*, *npmA* y *rmtA*, entre otros) y 3) producción de enzimas inactivadoras. Éste último constituye el mecanismo más frecuente de resistencia a aminoglicósidos y los genes responsables suelen localizarse en plásmidos y/o transposones (Shaw *et al.*, 1993). Existen más de 50 tipos de enzimas capaces de modificar la estructura de estos compuestos generando un producto que no puede actuar sobre el microorganismo. Estas enzimas se clasifican en tres tipos en función de la reacción que catalizan (Vakulenko *et al.*, 2003; Hobbie *et al.*, 2005):

- N-acetiltransferasas (AAC): transfieren un grupo acetilo desde el acetilcoenzima-A a un grupo amino del aminoglicósido. Están codificadas por los genes *aacC* [o *aac(3)*], responsables de la acetilación del grupo amino en la posición 3', y *aacA* [o *aac(6')*] grupo amino en la posición 6'. Confieren resistencia a gentamicina, tobramicina y otros aminoglicósidos.
- O-fosfotransferasas (APH): transfieren un grupo fosforilo desde el ATP a grupos hidroxilo de la molécula de aminoglicósido situados en posición 3', 3'' y 6. Están codificadas por los genes *aphA* [o *aph(3')*], *aphC* [o *aph(3'')*] y *aphB* [o *aph(6)*], respectivamente. El primero confiere resistencia a kanamicina y neomicina, mientras que los otros dos, a los que pertenecen los genes *strA* [*aph(3'')*-Ia] y *strB* [*aph(6)*-Id], confieren resistencia a estreptomina.
- O-adeniltransferasas (AAD) u O-nucleotidiltransferasas (ANT): catalizan una nucleotidilación, es decir, median la transferencia de un nucleótido monofostato desde un nucleótido trifostato a un grupo hidroxilo del aminoglicósido. En función de la posición en la que actúen encontramos enzimas codificadas por los genes *aadA* [o *ant(3'')*] que actúan en la posición 3'' y confieren resistencia a estreptomina y espectomicina, y

enzimas codificadas por los genes *aadB* [o [*ant(2'')*]], las cuales actúan en la posición 2'' y confieren resistencia frente a gentamicina, kanamicina y tobramicina.

Las **tetraciclinas** son un grupo de agentes bactericidas activos sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas que actúa inhibiendo la síntesis proteica por unión reversible a la subunidad ribosomal 30S. Existen cuatro mecanismos de resistencia a tetraciclinas: 1) mutaciones puntuales en el ARNr 16S, 2) presencia de bombas de expulsión, 3) inactivación enzimática y 4) protección ribosomal. Las bombas de expulsión son dependientes de energía y constituyen el mecanismo de resistencia a tetraciclinas más extendido tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (Chopra *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Gracias a ellas se consigue disminuir la concentración intracelular de las tetraciclinas, impidiendo así que alcancen el ribosoma y realicen su función (Chopra *et al.*, 2001). Están codificadas por los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(G)*. La protección del ribosoma, que es otro de los mecanismos más importantes, dificulta su interacción con las tetraciclinas, impidiendo la actuación de estas.

Los **macrólidos** (eritromicina, claritromicina, azitromicina, etc.) son antibióticos, de origen natural o sintético, que se caracterizan por poseer un anillo lactónico macrocíclico al que se unen uno o varios azúcares. Actúan sobre la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, uniéndose de forma reversible, lo que provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación. El mecanismo de resistencia más común implica la metilación de un residuo de adenina del ARNr 23S de la subunidad 50S que produce un cambio conformacional en el ribosoma reduciendo su afinidad por el antibiótico. Estas ARNr metiltransferasas están codificadas por los genes *erm*. Sin embargo, se han descrito otros mecanismos de resistencia a macrólidos basados en la presencia de enzimas modificadoras que inactivan a estos compuestos o en bombas de expulsión que evitan su acumulación en el interior de la célula bacteriana.

Los **fenícoles** son un grupo de compuestos con actividad bactericida y bacteriostática en función del microorganismo. Su penetración en el interior de la célula es un proceso dependiente de energía y una vez dentro inhiben la síntesis proteica mediante su unión a la subunidad ribosomal 50S. Entre ellos destaca el cloranfenicol que impide la formación de los enlaces peptídicos tras su unión a la subunidad 50S del ribosoma. La resistencia a cloranfenicol se encuentra asociada a diversos mecanismos: 1) reducción de la permeabilidad; 2) mutación ribosomal; 3) inactivación por acetiltransferasas, codificadas por los genes *cat*, que acetilan los dos radicales hidroxilo de la molécula de cloranfenicol y que según su estructura pueden ser de tipo A o B; 4) bombas de expulsión activa mediada por proteínas transportadoras específicas, como las codificadas por los genes *floR* y *cmlA* capaces de expulsar florfenicol y cloranfenicol o solamente el segundo, respectivamente.

1.5.1.3. Inhibición de la replicación de ADN

Las **quinolonas** son compuestos que ejercen una acción bactericida inhibiendo las topoisomerasas (ADN girasa y ADN topoisomerasa IV), enzimas que catalizan el superenrollamiento del ADN cromosómico (Drlica and Zhao, 1997; Hooper, 1998). Este grupo de antibióticos deriva de una molécula formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo de nitrógeno en la posición 1. Al igual que las cefalosporinas se pueden clasificar en generaciones: quinolonas de primera (ácido nalidíxico), segunda (ciprofloxacino) tercera y cuarta generación. Las quinolonas de segunda generación son también conocidas como quinolonas fluoradas o fluoroquinolonas, ya que incorporan un átomo de flúor en su estructura. Se han descrito cuatro mecanismos de resistencia a quinolonas, siendo el mecanismo principal, la alteración cromosómica del receptor. La resistencia cromosómica se debe a mutaciones espontáneas en los genes que codifican las subunidades de la enzima ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y ADN topoisomerasa IV (*parC* y *parE*), en concreto en la región de estas enzimas conocida como QRDR (“Quinolone Resistance Determining Region”), disminuyendo su afinidad por el antibiótico (Hooper, 2001). Además, mutaciones en genes cromosómicos, que conducen a la alteración de porinas (*OmpC* y *OmpF* en *S. enterica*) o a la superproducción de bombas de expulsión de múltiples compuestos (como AcrAB-TolC y MdtABC) pueden también conferir resistencia a quinolonas (Fernández and Hancock, 2012).

Existen otros tres mecanismos de resistencia a estos compuestos, codificados por plásmidos y conocidos como PMQR (“Plasmid-Mediated Quinolone Resistance”) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2011):

- El primero de ellos depende de genes *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrE* y *qnrS*), que actúan uniéndose al complejo que se forma entre el ADN y la ADN girasa, impidiendo la unión de las quinolonas a su sitio de actuación.
- El segundo mecanismo consiste en la acetilación de las moléculas de ciprofloxacina y norfloxacina por una enzima previamente conocida por su capacidad para modificar aminoglicósidos. La aparición de dos mutaciones puntuales en el gen *aac(6')-Ib* (que normalmente codifica para una enzima que confiere resistencia a amikacina, tobramicina y kanamicina) da lugar a una variante denominada *aac(6')-Ib-cr*, con capacidad de inactivar la ciprofloxacina y norfloxacina.
- El tercer mecanismo se debe a bombas de expulsión codificadas por los genes *qepA* y *oqxAB*.

1.5.1.4. Inhibición de la transcripción

La **rifampicina** es un antibiótico semisintético del grupo de las rifamicinas. Es el principal representante de este grupo de antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo el inicio de la transcripción de los ARNr y mensajeros (ARNm) mediante el bloqueo de la ARN polimerasa ADN-dependiente. La resistencia frente a rifampicina se debe a mutaciones puntuales en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la enzima.

1.5.1.5. Inhibición de la síntesis de ácido fólico

Las **sulfonamidas** y el **trimetoprim** son agentes que inhiben la biosíntesis de ácidos nucleicos al bloquear la formación de purinas y pirimidinas, interfiriendo en etapas consecutivas de la síntesis de un precursor, el ácido fólico. En la primera etapa, se obtiene ácido dihidropterico a partir de pteridina y ácido para-aminobenzoico. Las sulfonamidas son análogas antagonistas del ácido para-aminobenzoico, con el que compite por el sitio activo del enzima dihidropteroato-sintasa impidiendo la formación de ácido dihidropterico. Por adición del ácido glutámico se forma el ácido fólico, que será reducido por la enzima dihidrofolato reductasa dando lugar al ácido folínico (Calvo and Martínez-Martínez, 2009). En este paso de la ruta, el trimetoprim inhibe la dihidrofolato reductasa bloqueando la formación del ácido folínico. Los mecanismos desarrollados por las bacterias para resistir a la acción de estos compuestos suponen la síntesis de enzimas diana alternativas. En el caso de la resistencia a sulfonamidas, los genes responsables (*sul1*, *sul2* y *sul3*) codifican dihidropteroato sintetetasas a las que no se une el antibiótico, mientras que la resistencia a trimetoprim se debe a la producción de dihidrofolato reductasas alternativas. Estas últimas pueden ser de dos tipos en función de su estructura DfrA y DfrB. Debido al bloqueo secuencial ejercido por ambos antibióticos en diferentes puntos de la ruta, estos compuestos tienen un efecto sinérgico y suelen utilizarse en combinación.

1.5.1.6. Desestabilización de la membrana externa

La **colistina** también conocida como polimixina E, es un antibiótico aislado en 1949, cuyo uso en medicina fue suspendido en la década de los años 70 por sus efectos nefrotóxicos y neurotóxicos. Actualmente, debido al aumento de las resistencias y al lento desarrollo de nuevos antibióticos, ha sido recuperado como tratamiento de último recurso con uso restringido al ámbito hospitalario. Tiene actividad bactericida dependiente de concentración y actúa uniéndose al lípido A del LPS y los fosfolípidos de la membrana externa. Las aminas de las polimixinas se encuentran cargadas positivamente e interaccionan con los grupos fosfato del lípido A cargados

negativamente. Esto provoca la repulsión de los cationes de Mg^{2+} y Ca^{2+} , encargados de estabilizar la membrana, causando una expansión estructural. Esto hace que se genere la fusión de la capa interna de la membrana externa con la membrana citoplasmática, originando cambios que provocan la lisis de la bacteria (Trimble *et al.*, 2016; Aguayo *et al.*, 2016). Los mecanismos de resistencia a colistina, aunque son poco frecuentes (en aumento por su uso) están bien estudiados (Antoniadou *et al.*, 2007). El mecanismo principal implica modificaciones del lípido A debidas a mutaciones en el sistema regulador PhoPQ-PmrAB, que afectan tanto al gen *mrgB* como al gen *pmrB*. Mutaciones en el sistema PmrAB (“Polimxin resistance”) o el incremento en la expresión de los genes *pmrA* y *pmrB* se traduce en una disminución de la afinidad del antibiótico por el lípido A (Adams *et al.*, 2009). Otro mecanismo de resistencia implica la adición de cadenas adicionales de ácidos grasos a la estructura del lípido A impidiendo la entrada del antibiótico (Llobet *et al.*, 2011). En algunas especies bacterianas se ha descrito la pérdida total del LPS haciendo inviable la acción de las polimixinas. Además, existen otros mecanismos no relacionados con el LPS como son la cantidad de polisacáridos capsulares (Llobet *et al.*, 2008), y la expresión de bombas de expulsión asociadas a la resistencia en Gram negativas. Todos estos mecanismos se encuentran codificados en el cromosoma. Sin embargo, también se han descrito mecanismos de codificación plasmídica, mediados por los genes *mcr* (Liu *et al.*, 2015). Estos genes codifican una fosfoetanolamina transferasa con capacidad para modificar el lípido A disminuyendo la afinidad de la polimixina por el receptor.

1.5.1.7. Daño a macromoléculas celulares

Los nitrofuranos, entre los que se encuentra la nitrofurantoína, son una clase de agentes quimioterápicos sintéticos que se caracterizan por presentar uno o más grupos nitro en un núcleo heterocíclico o aromático (McCalla, 1979). Son eficaces frente a un gran número de bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo muchas de las implicadas en infecciones del tracto urinario. El mecanismo de actuación de estos compuestos no se conoce con exactitud. Sin embargo, se demostró que es necesaria su reducción por nitroreductasas bacterianas, como NfsA y NfsB, para que muestren actividad. Los intermediarios de vida corta generados durante el proceso de reducción son las formas bioactivas, responsables del daño al ADN y las proteínas mediante la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y de otros procesos celulares. La resistencia a los nitrofuranos se debe a mutaciones en los genes *nfsA* y *nfsB* que codifican las nitroreductasas, capaces de disminuir o eliminar la funcionalidad de estas enzimas.

1.5.2. Mecanismos de resistencia a biocidas

Los biocidas son agentes antimicrobianos que se utilizan como antisépticos, desinfectantes, higienizantes y/o conservantes en hospitales y en industrias farmacológicas, agroalimentarias y cosméticas. A diferencia de los antibióticos, no son suficientemente selectivos para poder utilizarse dentro del organismo (“within body tissues”) aunque si pueden ser empleados por vía tópica. Entre estos agentes pueden incluirse un gran número de compuestos químicos (colorantes, compuestos fenólicos, compuestos halogenados, detergentes catiónicos, etc) que actúan sobre numerosas dianas celulares (membrana plasmática, pared bacteriana, etc) y se utilizan en dosis letales para los microorganismos (Wales and Davies, 2015).

Entre los biocidas más utilizados se encuentran los compuestos de amonio cuaternario (QAC). Estos se emplean para la desinfección en hospitales y granjas, para el tratamiento de agua y en productos farmacéuticos, higiénicos y cosméticos. Actúan uniéndose a las membranas celulares que pierden su integridad y finalmente liberan el contenido celular. La resistencia a estos compuestos se ha asociado a mutaciones en los genes (*omp/opr*) que conducen a una disminución en la síntesis de porinas de la membrana externa y a la sobreexpresión de genes de bombas de expulsión de múltiples drogas (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012). Entre estos últimos se encuentran los genes *qac* que codifican un intercambiador droga/ H⁺ de la familia SMR (Small multidrug resistance). Se han identificado varios miembros (*qacE*, *qacEΔ1*, *qacH/I*, *qacF/L*, *qacG*) pero el más abundante es *qacEΔ1* que codifica una variante parcialmente funcional que se diferencia de la sintetizada a partir de *qacE* en el extremo C-terminal (Kazama *et al.*, 1999). El gen *qacEΔ1* está ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas y se localizan en la región conservada 3' (3'CS) de los integrones de clase 1, incluidos los integrones complejos como el In4 presente en la SGI-1 de *Salmonella* (Paulsen *et al.*, 1993; Slipsky *et al.*, 2021; ver apartado 1.5.4.1).

1.5.3. Mecanismos de resistencia a metales pesados

Al igual que los biocidas, muchos metales pesados tienen actividad antimicrobiana y con frecuencia se incluyen dentro de ellos. Algunos como el hierro y el cobre, son esenciales para el correcto funcionamiento celular pero resultan tóxicos a altas concentraciones. Otros no desempeñan funciones biológicas conocidas y pueden ser tóxicos incluso a concentraciones muy bajas (mercurio y el arsénico) o presentar una toxicidad relativamente baja (plata y cobre) (Wales and Davies, 2015; Argudín *et al.*, 2019; Pal *et al.*, 2017). Los metales pesados se han venido utilizado en hospitales como desinfectantes (mercurio y plata), en apósitos para heridas por quemaduras y en catéteres (plata), en agricultura como pesticidas (mercurio) y, a pesar de su toxicidad, como promotores del crecimiento animal y prevención de enfermedades entéricas,

principalmente en el sector porcino y avícola (cobre, zinc e incluso arsénico). A diferencia de los biocidas, no se utilizan a concentraciones letales sino inhibitorias (Wales and Davies, 2015; Argudín *et al.*, 2019; Pal *et al.*, 2017).

Los metales pesados pueden actuar mediante diversos mecanismos. Muchos de los efectos tóxicos que presentan se deben a su capacidad para provocar la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, que afectan a la actividad de las biomoléculas, por ejemplo dando lugar a la oxidación de las cadenas laterales de diferentes aminoácidos interfiriendo con la actividad de las proteínas, a la peroxidación de lípidos que a su vez altera la estructura y permeabilidad de las membranas o al ataque a azúcares y bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos produciendo depurinización de bases y cortes en el DNA. Además, también pueden afectar a la actividad de las proteínas reemplazando iones metálicos esenciales que actúan como cofactores y uniéndose a los grupos tiol libres (Jan *et al.*, 2014; 2015).

El amplio uso metales pesados como agentes antimicrobianos, en especial como promotores de crecimiento animal, y también de biocidas, ha dado lugar a la selección de bacterias resistentes a estos compuestos lo cual a su vez ha provocado un aumento de cepas resistentes a antibióticos (Pal *et al.*, 2017). Esto último puede ocurrir mediante diferentes mecanismos entre los que caben citar la co-residencia de los genes en un mismo elemento móvil (plásmido, integrón, transposón o isla genómica) y la resistencia cruzada cuando por ejemplo una misma bomba de expulsión puede exportar una gran variedad de compuestos (Wales and Davies, 2015).

Dada su importancia en el desarrollo de este trabajo, se describen brevemente los mecanismos de resistencia a los metales pesados mercurio, cobre y plata y arsénico.

1.5.3.1. Resistencia a mercurio

El mercurio puede estar presente tanto en forma inorgánica como orgánica y ambas resultan altamente tóxicas (Hobman and Crossman, 2015). Las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en presencia de mercurio. Uno de los más estudiados es el codificado por los genes *mer* que se encuentra tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Pal *et al.*, 2017; Argudín *et al.*, 2019). Los genes *mer* presentan una organización variable que incluye al menos los genes *merP* y *merT* que codifican proteínas implicadas en la unión y transporte de Hg^{2+} , respectivamente, y el gen *merA* que codifica una reductasa (Figura 10). La transcripción de los genes *mer* requiere la proteína reguladora MerR, producto del gen *merR* que se activa en presencia de Hg^{2+} y se transcribe de forma independiente al resto de los genes, que constituyen un operón.

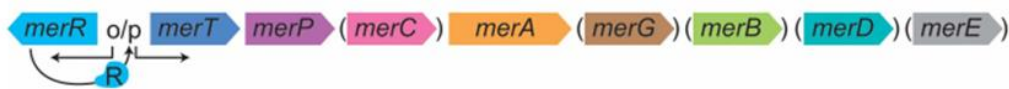


Figura 10. Organización de los genes *mer*. Se muestran todos los genes descritos, aunque no siempre estén presentes (indicados en la figura entre paréntesis) (Boyd and Barkay, 2012).

Como se comentó anteriormente, el mercurio puede estar presente en forma inorgánica u orgánica. Ambas formas pueden ser transportadas de manera inespecífica a través de porinas de la membrana externa. En el espacio periplásmico el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) se une a la chaperona MerP que lo cede a MerT para su transporte al interior de la bacteria. Ahí, la proteína MerA lo reduce a Hg^0 que es volátil y difunde al exterior. La resistencia a compuestos orgánicos como $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$ requiere además la presencia del gen *merB* que codifica una organomercurio liasa. Una vez estos compuestos pasan al periplasma la liasa rompe el enlace C-Hg liberando Hg^{2+} que finalmente va a ser reducido por MerA y eliminado al exterior. Otros genes que pueden estar presentes en el operon son *merC* y *merE* que codifican transportadores de la membrana interna, *merD* que codifica una proteína reguladora implicada en la resistencia a organomercuriales y *merG*, que participa en la resistencia a fenilmercurio. (Wales and Davies, 2015; Pal *et al.*, 2017; Argudín *et al.*, 2019).

1.5.3.2. Sistemas de homeostasis de cobre y resistencia a plata

Como se comentó anteriormente, el cobre es un metal esencial para los organismos y sin embargo cuando se encuentra en alta concentración resulta tóxico. Las bacterias han desarrollado mecanismos que les permiten mantener una homeostasis adecuada, de forma que existan los niveles de cobre necesarios para llevar a cabo sus funciones celulares evitando un exceso que puede provocar toxicidad. La mayoría de bacterias Gram-negativas entre ellas *E. coli* usan los sistemas cromosomales *cue* y *cus*, y algunas cepas el sistema *pco* de codificación plasmídica (Fig 11; Rensing and Grass., 2003). *Salmonella* carece del sistema *cus* pero algunas cepas llevan el sistema *sil*, relacionado con *cus*, que confiere resistencia a cobre y plata (Fookes *et al.*, 2011). Este sistema se identificó inicialmente en plásmidos procedentes de aislamientos asociados a un brote de pacientes de una unidad de quemados que habían sido tratados con nitrato de plata (Gupta *et al.*, 1999) y posteriormente en el cromosoma de cepas monofásicas de *Typhimurium* y el serotipo Rissen. El sistema *pco* se encuentra con frecuencia adyacente al *sil* o al *cus* formando lo que se conoce con el nombre de “CHASRI” (“Copper Homeostasis and Silver Resistance Island”) (Stahlin *et al.*, 2016).

El sistema *pco* solo es activo en condiciones aeróbicas y parece que su contribución a la resistencia total a cobre en estas condiciones es minoritaria (Arai *et al.*, 2019). Incluye los operones *pcoABCDRS* y *pcoGFE* además de un segundo gen *pcoE* independiente (Fig. 11B). En

INTRODUCCIÓN

relación a las proteínas codificadas por el primer operón, se sabe que PcoA es una cobre oxidasa, PcoC una chaperona periplasmática, PcoD un transportador de Cu^{+1} de la membrana interna y PcoB un transportador de Cu^{+2} de la membrana externa. La regulación tiene lugar a través del sistema de dos componentes codificado por los genes *pcoS* y *pcoR*. El Cu^{+1} entra en la bacteria a través de porinas. Al aumentar los niveles de Cu^{+1} en el espacio periplásmico, éste se une al sensor PcoS que activa a PcoR, el cual estimula la transcripción del operón. La chaperona PcoC une al metal y lo transfiere a PcoD que lo transporta al citoplasma donde es utilizado para cubrir las necesidades celulares. PcoC también cede el Cu^{+1} a la proteína PcoA que oxida el Cu^{+1} a Cu^{+2} (menos tóxico) que sale al exterior a través de la bomba de expulsión PcoB. En cuanto al segundo operón, *pcoE* codifica una proteína del periplasma capaz de unir Cu^{+} y parece constituir una primera línea de defensa atrapando Cu^{+1} hasta que el resto del sistema este activo. Sin embargo, la función de las proteínas codificadas por *pcoG* y *pcoF* no se conoce todavía.

El sistema *sil* responsable de la resistencia a cobre y plata está organizado en tres unidades transcripcionales (Figura 11C; Gupta *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2006), los operones *silCFBAGP* y *silRS* y el gen *silE* que se transcribe independientemente y sólo actúa en condiciones anaeróbicas. El gen *silP* codifica una ATPasa de tipo P que transporta iones desde el citosol al espacio periplásmico y los genes *silABC* a los 3 componentes de un intercambiador $\text{H}^{+}/\text{Ag}^{+}$; que transporta el metal desde el espacio periplásmico al exterior. Las proteínas SilF y SilG al igual que SilE parecen actuar como chaperonas. El operón *silCFBAGP* está regulado por un sistema de dos componentes codificado por el operón *silRS*. Cuando los niveles de Cu^{+} y/o Ag^{+} son altos, estos metales se unen al sensor SilS que activa al receptor SilR el cual activa la transcripción del operón. Entonces la ATPasa SilP bombea los cationes al espacio periplásmico donde se unen a la chaperona SilF que los lleva hacia el intercambiador SilABC el cual los expulsa al exterior (Gupta *et al.*, 1999; Silver *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2017).

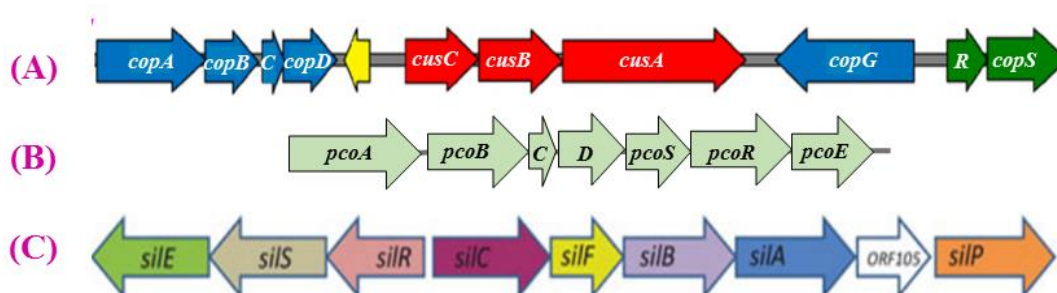


Figura 11. Organización de diferentes operones implicados en la homeostasis del cobre y plata. Se muestran todos los genes descritos, aunque no estén presentes en todas las bacterias.

(A) Organización de los operones *cop* y *cus* (Modificada de Mergeay *et al.*, 2003).

(B) Organización del operón *pco* (Modificada de Gutiérrez- Barranquero *et al.*, 2012).

(C) Organización del operón *sil* (Tomada de Randall *et al.*, 2015).

1.5.3.3. Resistencia a arsénico

El arsénico puede encontrarse de muchas formas en la naturaleza, siendo el arsenito [As(III)] y el arseniato [As(V)] las formas inorgánicas más abundantes. La resistencia a arsénico inorgánico está mediada por el operón *ars*, activo en condiciones aerobias y anaerobias (Silver and Phung, 2005). Al igual que se describió para el operon *mer*, existe gran variabilidad en cuanto al número de genes presentes en el operón *ars* como el formado por los genes *arsRDABC* y la versión más reducida con solo tres genes, *arsBCR*, que proporcionan una resistencia menor a las bacterias portadoras (Figura 12) (Lin *et al.*, 2006; Sampei *et al.*, 2010). El gen *arsC* codifica una reductasa implicada en la reducción de As(V) a As(III) en el citoplasma, *arsB* una bomba de expulsión de As(III) de la membrana interna y *arsA* una ATPasa que se asocia a ArsB.

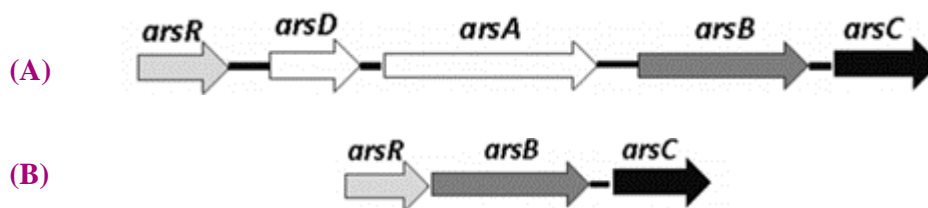


Figura 12. Organización del operón *ars*.

(A) Representación de operón *ars* en *E. coli* R773 (Chen *et al.*, 1986)

(B) Representación del operón cromosómico *ars* en *E. coli* (Carlin *et al.*, 1995).

El sistema está regulado a través del represor codificado por el gen *arsR* que junto con el co-represor ArsD mantiene al operón inactivo en ausencia de As(III) (Rosen, 2002). Si el As(III) está presente, entra en las células a través de acuaporinas y se une al complejo ArsR-ArsD con lo cual este se libera del promotor activándose la transcripción. ArsD libre, que también actúa como chaperona, pasa el metal a la bomba ArsB/ArsA para su expulsión. Por su parte, el As(V), que entra en las células a través de transportadores de fosfato de la membrana interna, es primeramente transformado en As(III) por la reductasa ArsC.

Además de la resistencia a arsénico inorgánico, se han identificado genes que confieren resistencia a compuestos organoarsenicales. Entre ellos cabe mencionar el gen *arsI* que codifica una liasa que rompe el enlace C-As de derivados metilados altamente tóxicos liberando formaldehído, *arsP* que codifica una bomba de expulsión de compuestos orgánicos de arsenito y *arsH* que codifica una flavoproteína dependiente de NADP⁺ que oxida el arsenito a arseniato, con menor toxicidad (Fekih *et al.*, 2018; Argudin *et al.*, 2019).

1.5.4. Elementos implicados en la transferencia horizontal de la resistencia

En la dispersión de la resistencia a los agentes antibióticos juegan un papel fundamental los EGMs, entre los que destacan el sistema integrón-casete génica, las secuencias de inserción, los transposones, los plásmidos y las islas genómicas (Cantón *et al.*, 2003; Baquero, 2004; Miriagou *et al.*, 2006).

1.5.4.1. Sistema integrón-casete génica

Las **casetes génicas** son unidades genéticas móviles que contienen un sitio de recombinación específico denominado *attC*, responsable del reconocimiento y movilización de las casetes, así como una única *orf* implicada generalmente en la resistencia a antibióticos. Estos elementos carecen de mecanismos de replicación y/o transposición, así como de promotor. Pueden encontrarse en la naturaleza de forma libre como moléculas circulares covalentemente cerradas, siendo su inserción en los integrones lo que las convierten en genes funcionales (Carattoli, 2001a).

Debido a ello, los **integrones** se consideran sistemas naturales de clonación y expresión que incorporan *orfs* mediante recombinación específica de sitio. Están formados por el gen *intI* que codifica una integrasa, el sitio primario de recombinación (*attI*) y uno o más promotores, responsables de la expresión de las casetes incorporadas (Stokes and Hall, 1989; Carattoli, 2001a). La integrasa cataliza un proceso de recombinación entre el sitio primario *attI* del integrón y el sitio *attC* localizado en la casete génica. En función de la naturaleza de las casetes, los integrones pueden clasificarse en dos tipos (Fluit and Schmidt, 2004): 1) **integrones móviles o de resistencia (RI)**, los cuales contienen fundamentalmente genes de resistencia a antibióticos y suelen localizarse en transposones, tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano y, 2) **integrones cromosómicos o Super-Integrones**, presentes en el cromosoma de diversas especies bacterianas, de mayor tamaño, ya que contienen hasta 200 casetes génicas que codifican una gran variedad de funciones.

En la actualidad se conocen hasta nueve clases de integrones, que se definen en base a sus tres componentes conservados, el gen *intI*, el sitio *attI* y el/los promotores, siendo los de clase 1 los más frecuentes en aislamientos de bacterias patógenas Gram negativas incluida *Samonella* (Figura 13; Guerra *et al.*, 2000; Carattoli, 2001a; Rodríguez *et al.*, 2006a; Rodríguez *et al.*, 2008). Estos integrones constan de una región variable que se encuentra flanqueada por segmentos 5' y 3' constantes (5'CS y 3'CS). El segmento 5'CS aporta un gen que codifica una integrasa (*intI*) y uno o más promotores para la expresión de las casetes (Figura 13A). El segmento 3'CS incluye genes de resistencia a compuestos derivados de amonio cuaternario (*qacEAI*), sulfonamidas (*sulI*) y una *orf* de función desconocida (*orf5*) (Fluit and Schmidt,

2004). Los integrones de clase 1 se localizan normalmente en transposones de tipo Tn21 (Lieber *et al.*, 1999; Caratolli, 2001a). Existen también integrones de clase 1 con segmentos 3'CS diferentes, que contienen el gen *sul3* de resistencia a sulfonamidas en vez del gen *sul1* y que se clasifican en varios tipos dependiendo de la región variable (Figura 13B).

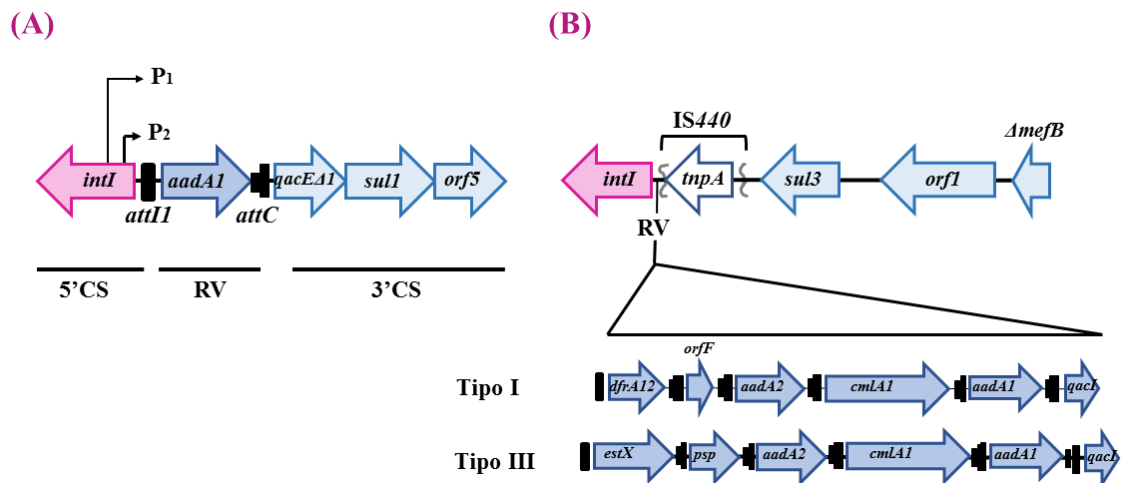


Figura 13. Representación esquemática de integrones de clase 1 de tipo *sul1* (A) y de tipo *sul3* (B). RV: Región Variable; CS: Segmento Conservado; IS: Secuencia de Inserción; *orf*: pauta abierta de lectura (“Open ReadinG Frame”) (Modificado de P. García, Tesis doctoral, 2013).

Además, en la década de los 90 se describieron los denominados integrones de clase 1 complejos (Stokes *et al.*, 1993), que contienen una región común (CR) delimitada por dos copias del 3'-CS, una de ellas truncada. Cuando se demostró la relación existente entre CR, que incluye una ORF conocida como *orf513* o *rcr*, con la secuencia de inserción IS91 (Ver apartado 1.5.4.2.1), esta región pasó a denominarse ISCR (Toleman *et al.*, 2016).

1.5.4.2. Elementos genéticos transponibles

Además del sistema integrón-casete génica, dos clases de EGMs desempeñan un importante papel en la captura y movilización de genes de resistencia en bacterias Gram negativas: las secuencias de inserción y los transposones. Se trata de segmentos de ADN que se mueven en el genoma bacteriano desde un sitio denominado donador a otro denominado receptor. El segmento se denomina secuencia de inserción si solo contiene ADN relacionado con la transposición y transposón cuando contiene uno o más genes adicionales que aportan a la bacteria características fenotípicas detectables, como resistencia a antibióticos (Siguier *et al.*, 2017).

1.5.4.2.1. Secuencias de inserción

Las secuencias de inserción (ISs) “clásicas” son los elementos genéticos transponibles más simples cuyo tamaño oscila entre 700 y 2,500 pb (Mahillon and Chandler, 1998). Contienen al menos una *orf* que codifica la enzima transposasa. La región codificadora está flanqueada por Repeticiones terminales Invertidas (IRs) de 10-40 pb, designadas IR_L e IR_R según se sitúen a izquierda o derecha en relación a la dirección de transcripción de la(s) *orf*(s). Las IRs actúan como sitio de reconocimiento de la transposasa. Esta enzima escinde la IS y la inserta en otra zona del genoma mediante un proceso de transposición conservativa (conocido también como “cut and paste”) que da lugar a inserciones simples, o replicativa (“copy and paste”). En el segundo caso tiene lugar la replicación de la IS, manteniéndose una copia en el sitio donador y apareciendo otra copia en el sitio receptor (Chandler and Mahillon, 2002). La transposición de la mayoría de las ISs genera duplicaciones directas (DRs) de un número reducido de pares de bases (entre 2 y 14) originalmente presentes en el sitio receptor. Se conocen al menos 30 familias de ISs, establecidas en función de su transposasa y las repeticiones invertidas (Siguiet *et al.*, 2014; 2015; He *et al.*, 2015). Las ISs se encuentran ampliamente distribuidas en bacterias, contribuyendo enormemente a la variabilidad de los genomas. Esto se debe a que, además de inserciones, pueden originar mutaciones, deleciones y/o inversiones, provocadas bien por su movilización o bien por recombinación homóloga entre copias repetidas de la misma IS. Destacan por su importancia en esta Tesis Doctoral, *IS1*, *IS10*, *IS26*, *ISEcp1*, *IS91* e *ISCR*.

- *IS1*: Es una de las primeras secuencias de inserción descubiertas y una de las que tiene menor tamaño. Consta de 768 pb que incluyen IRs de aproximadamente 23 pb localizadas en sus extremos y dos *orfs* (*insA* e *insB*) que solapan parcialmente y se fusionan mediante el mecanismo de deslizamiento translacional, dando lugar a la transposasa funcional. La transposición de *IS1* va acompañada de la duplicación de 9 pb del sitio de inserción, aunque también se han observado DRs de 8, 10 o 14 pb (Chandler and Mahillon, 2002). *IS1* puede moverse mediante transposición conservativa o replicativa.
- *IS10* tiene una longitud de 1.329 pb, IRs de 22 pb y se transpone por el mecanismo conservativo generando DRs de 9 pb.
- *IS26*: Es una de las secuencias de inserción más frecuentes en bacterias Gram negativas MDR, desempeñando un papel esencial en la construcción de regiones complejas de resistencia. Tiene 820 pb, está flanqueada por IRs de 14 pb, contiene una única *orf* que codifica la enzima transposasa y puede generar DRs de 8 pb. *IS26* utiliza dos mecanismos de transposición diferentes:
 - 1) Un **mecanismo replicativo** que es característico de *IS26* y se conoce como “copy in”, durante el cual se replica tanto la IS como 8 pb inicialmente presentes en el sitio de inserción que es aleatorio (Figura 14; He *et al.*, 2015). Las consecuencias de la

transposición replicativa de IS26 varían dependiendo de si el sitio receptor de encuentra en la misma (transposición intramolecular) o en diferente molécula (transposición intermolecular) que el sitio donador. La **transposición intermolecular** de IS26 (Figura 14A) conduce exclusivamente a la formación de cointegrados, que resultan de la fusión de la molécula donadora portadora de la IS con la molécula receptora carente de ella. Ambas moléculas quedarán unidas a través de las dos copias de IS26 en orientación directa, resultantes de la replicación. La resolución del cointegrado solo puede ocurrir por recombinación homóloga entre ambas copias, separándose la molécula donadora original de una molécula receptora modificada, que contiene la IS26 flanqueada por DRs. En la **transposición intramolecular** (Figura 14B) el extremo 3'-OH de la secuencia de inserción liberado por acción de la transposasa puede actuar sobre el sitio de inserción atacando a la cadena superior (ataque en *cis*) o a la cadena inferior (ataque en *trans*). El ataque en *cis* provoca la delección del ADN comprendido entre la IS y el sitio de inserción, quedando una única copia de la IS. Se forma, además, un producto circular donde se encuentra segunda IS, cuya supervivencia se logrará si puede incorporarse en un sitio receptor mediante transposición conservativa, en forma de TU (ver más adelante) o si posee un origen de replicación. Ninguna de las dos copias de IS26 estará flanqueada por DRs, que quedarán repartidas entre los dos productos resultantes de la delección. El ataque en *trans* dará lugar a la duplicación de IS26 en orientación opuesta y a la inversión del segmento situado entre la IS26 inicial y el sitio de inserción. En este proceso también se generan DRs pero la posición y orientación de una de ellas se altera a consecuencia de la inversión.

- 2) Un **mecanismo conservativo y dirigido**, recientemente descubierto, en el que intervienen al menos dos copias de IS26, una (o más) presentes en la molécula donadora y otra en la molécula receptora (Figura 14C; Hammer *et al.*, 2014). La unidad de movimiento, denominada TU (“Translocatable Unit”) consiste en una copia de IS26 junto con ADN adyacente, que puede extenderse hasta una segunda copia de IS26 presente en la molécula donadora. El TU se inserta preferentemente próximo a la IS26 de la molécula receptora, por un proceso dependiente de la transposasa que guarda similitud con la recombinación específica de sitio. Al igual que la transposición replicativa intermolecular, dicho proceso conduce a la formación de un cointegrado, pero en este caso el mecanismo es conservativo, ya que la secuencia de inserción no se replica ni tampoco se generan DRs. Este mecanismo ayuda a entender como tiene lugar la formación de regiones complejas, encontradas frecuentemente en plásmidos o en el

INTRODUCCIÓN

cromosoma, que constan de genes de resistencia flanqueados por IS26. Su frecuencia es unas 50 veces superior a la frecuencia de la transposición replicativa.

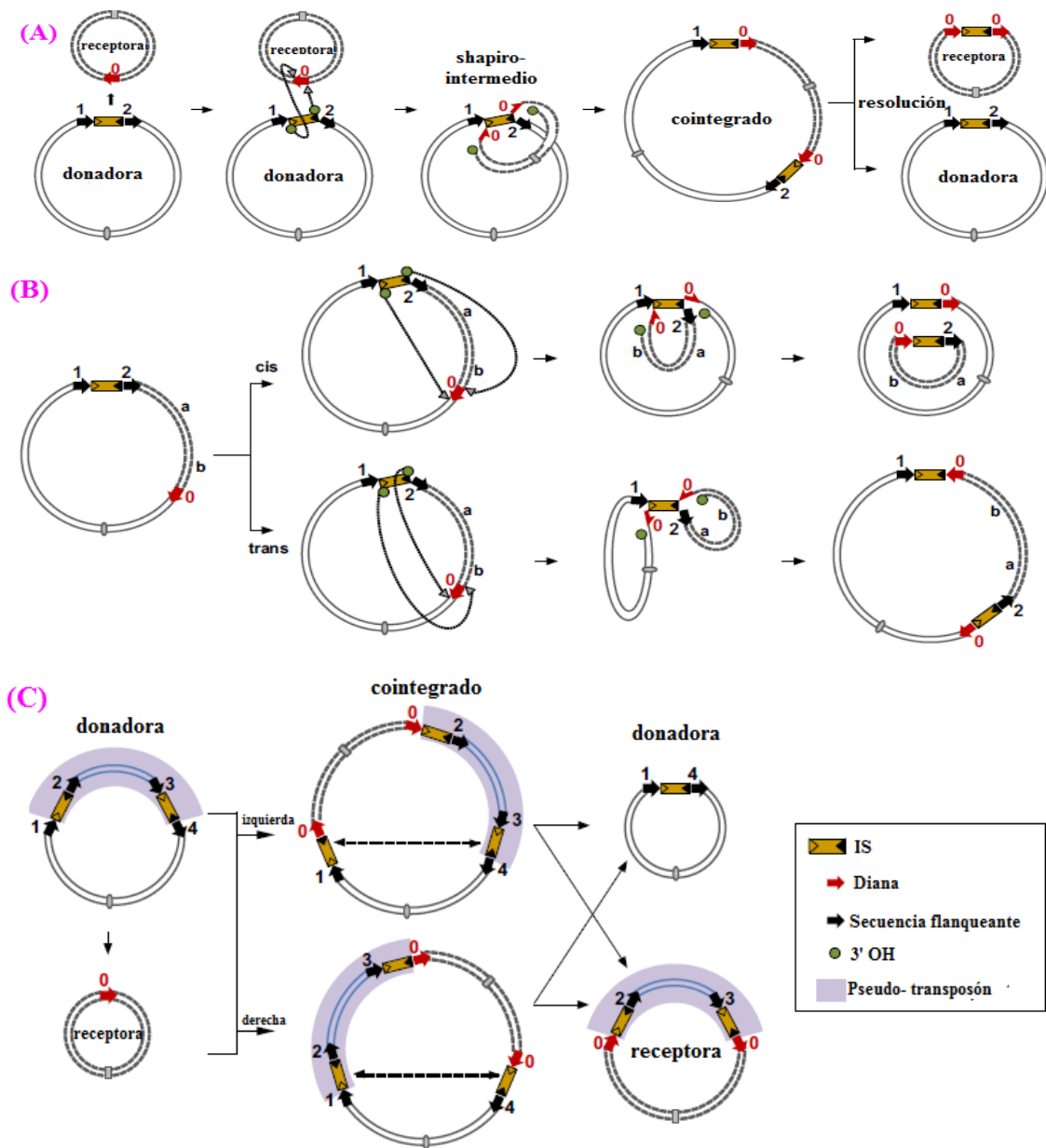


Figura 14. Esquema de la transposición replicativa mediada por una secuencia de inserción. (Modificada de He *et al.*, 2015):

- (A) Transposición intermolecular.
- (B) Transposición intramolecular.
- (C) Transposición intermolecular de un pseudo-transposón.

Aunque, por definición, las IS “clásicas”, como IS1, IS10 e IS26, solo contienen genes implicados en el proceso de transposición, dos copias de la misma IS pueden insertarse a ambos lados de un gen de resistencia, dando lugar a un transposón compuesto, con la capacidad de moverse como una unidad, o a un pseudo-transposón (ver apartado 1.5.4.2.2). Sin embargo, se

han descrito otras ISs que, en copia única, pueden capturar y movilizar genes de resistencia, diluyéndose así la distinción entre IS y transposón (Patridge, 2011). Entre estas últimas se encuentran *ISEcp1*, *IS91* e *ISCR*.

- ***ISEcp1***: De 1.656 pb, está flanqueada por IRs de 14 pb (IR_L e IR_R). Sin embargo, es capaz de movilizar ADN adyacente cuando no reconoce a IR_R sino a una secuencia débilmente relacionada, denominada IR_{alt} , en combinación con IR_L . Durante este proceso se generan DRs de 5 pb que delimitan a la unidad de transposición completa, desde IR_L hasta IR_{alt} . El ADN adicional, presente en dicha unidad puede incluir genes de resistencia, de ahí el importante papel que desempeña *ISEcp1* en la captura y movilización de estos genes.
- ***IS91***: Es una secuencia de inserción atípica, que se transpone mediante el mecanismo del círculo rodante. Está flanqueada por IRs imperfectas de 6-7 pb, se inserta de manera específica en los tetranucleótidos GAAC y CAAG y no origina DRs. Contiene una única ORF que codifica la enzima replicasa flanqueada por los sitios *oriIS* y *terIS*. La replicación transcurre desde *oriIS* hasta *terIS*, pero *IS91* puede capturar genes adicionales cuando la replicación no se detiene en *terIS* sino que se extiende al ADN adyacente. Esto ocurre con una frecuencia del 1 al 10% de los sucesos de transposición.
- ***ISCR***: Las *ISCR* (ver apartado 1.5.4.1) utilizan probablemente el mismo mecanismo que *IS91* para capturar genes adyacentes. Hasta el momento se han identificado más de 20 *ISCR*, agrupadas en diferentes familias (*ISCR1*, *ISCR2*, *ISCR3*, etc.). Al igual que *ISEcp1*, *IS91* e *ISCR* contribuyen de manera significativa a la movilización de genes de resistencia.

1.5.4.2.2. Transposones

Los transposones son EGMs que poseen la maquinaria necesaria para promover su propia translocación, desde un sitio donador a un sitio receptor, en ausencia de homología. Además, a diferencia de las IS “clásicas”, contienen genes accesorios implicados en la resistencia a antibióticos (Kleckner, 1981). Existen varias clases de transposones:

- **Transposones de clase 1 o compuestos**: Son estructuras modulares formadas por una secuencia central variable compuesta por genes de resistencia a antibióticos y, flanqueada en sus extremos por dos copias idénticas o casi idénticas de una misma secuencia de inserción (IS), que pueden aparecer en el mismo sentido o, más comúnmente, en sentidos opuestos. Se denominan IS-L (izquierda) e IS-R (derecha). Las IS aportan la maquinaria necesaria para llevar a cabo la transposición, incluido el gen que codifica la transposasa (Bennett, 2008). Entre ellos destacan los transposones Tn9, de 2,6 Kb, formado por dos copias de *IS1* que flanquean al gen *catA1a* de resistencia a cloranfenicol (Alton and Vapnek, 1979), y el transposón Tn10 de unas 9,2 Kb, que se encuentra delimitado por dos

copias de la secuencia de inserción *IS10* y contiene los genes *tet(B)* y *tetR* de resistencia a tetraciclina, además de *tetC* y *tetD*.

- Pseudo-transposones compuestos (PCT, Pseudo Compound Transposons; Galas and Chandler, 1989; Harmer *et al.*, 2020). Son estructuras flanqueadas por dos copias de *IS26* u otros miembros de la misma familia. Se asemejan a transposones compuestos pero no pueden moverse como una unidad e incluso así, solo lo hacen si ambas ISs se encuentran en la misma orientación (Harmer *et al.*, 2020). Al igual que la transposición de *IS26*, el movimiento de un pseudo-transposón puede ocurrir por dos rutas diferentes (Figura 14C). La primera implica la formación de un cointegrado, gracias al mecanismo de “copy-in” catalizado por la transposasa, seguida de la resolución del cointegrado por recombinación homóloga. Esta ruta tiene lugar cuando *IS26* no está presente en la molécula receptora. Implica la replicación de una de las copias de *IS26* que flanquean el PCT, de modo que el cointegrado contendrá tres copias de la IS. También se replican 8 pb presentes en el sitio de inserción generándose DRs. La segunda ruta se inicia con la formación de una unidad de translocación (TU, Translocatable Unit) por recombinación homóloga entre las dos copias de *IS26* presentes en el PCT en la misma orientación. A continuación, se forma un cointegrado entre el TU y la molécula receptora, en un proceso catalizado por la transposasa (Harmer *et al.*, 2020). En esta ruta, que es conservativa, *IS26* no se replica y tampoco se generan DRs.
- Transposones de clase 2 o complejos: Constituye el grupo de elementos transponibles más ampliamente distribuido entre las especies bacterianas. Son estructuras relativamente grandes flanqueadas por repeticiones terminales invertidas de unas 38-40 pb. Contienen los genes *tnpA* y *tnpR* que codifican una transposasa y una resolvasa respectivamente, implicadas en su movilización, así como otros genes accesorios y los sitios *res*. La transposición de estos elementos ocurre en dos etapas y es de tipo replicativo. TnpA participa en la primera etapa en la que tiene lugar la replicación del transposón y de una serie de nucleótidos presentes inicialmente en el sitio diana de la inserción, generando las DRs, mientras que TnpR cataliza la recombinación sitio-específica entre las secuencias *res* de cada una de las copias del transposón. Dentro de este grupo destaca el subgrupo Tn21 perteneciente a la familia Tn3 cuyo papel en la diseminación de la resistencia a antibióticos es fundamental. Tn21 es un transposón de 19,7 Kb compuesto por genes (*tnpA*, *tnpR* y *tnpM*) y secuencias (IRs y sitios *res*) implicadas en su transposición, el integrón de clase 1 In2 y el locus *mer* (Liebert *et al.*, 1999; Carattoli *et al.*, 2001a).

1.5.4.2.3. Plásmidos de resistencia

En *Salmonella*, al igual que en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, los genes de resistencia se localizan frecuentemente en plásmidos, como genes aislados o formando agrupaciones más o menos complejas, denominadas islas o regiones de resistencia. Los plásmidos están presentes en casi todas las especies bacterianas y su tamaño varía considerablemente, desde 2 Kb hasta 400 Kb, aproximadamente. Algunos de ellos son considerados epidémicos debido a su elevada prevalencia entre las poblaciones bacterianas (Bennett, 2008; Carattoli, 2009).

Los plásmidos juegan un papel fundamental en la diversidad bacteriana gracias a la adquisición y/o pérdida de genes y su capacidad de transferencia horizontal. Este hecho supone un aspecto clave en la dispersión de la resistencia, aportada frecuentemente por otros elementos genéticos como integrones, secuencias de inserción y transposones, dando lugar a estructuras complejas que son responsables, en gran medida, del fenómeno mundial de la multirresistencia (MDR, “Multi-Drug Resistance”). Sin embargo, también existen plásmidos denominados crípticos, que no confieren ninguna función a la bacteria que los porta.

1.5.4.2.4. Plásmidos híbridos implicados en virulencia y resistencia

En un capítulo anterior de esta introducción (1.4.5), se describió la presencia de plásmidos portadores de genes de virulencia específicos de serotipo, como el pSLT de Typhimurium. Desafortunadamente, también se ha descrito la adquisición de genes de resistencia por parte de los plásmidos de virulencia dando lugar a los plásmidos de virulencia-resistencia (VR), así como la adquisición de genes de virulencia por parte de los plásmidos de resistencia dando lugar a plásmidos de resistencia-virulencia (RV) (Rodicio *et al.*, 2011). La asociación de determinantes que codifican genes de resistencia y virulencia es algo preocupante especialmente cuando afecta a bacterias patógenas de seres humanos y animales.

1.5.4.2.5. Elementos integrativos y conjugativos (ICEs) y elementos integrativos y movilizables (IMEs)

Los Elementos Integrativos y Conjugativos (ICEs) son elementos genéticos móviles auto-transmisibles, que contienen un origen de transferencia y los genes necesarios para mediar la conjugación (Burrus *et al.*, 2002). Estos elementos, también conocidos como transposones conjugativos, se escinden mediante recombinación sitio-específica, se circularizan y se replican. Posteriormente son transferidos a la célula receptora por conjugación donde se integran también por recombinación específica de sitio en el cromosoma del hospedador, mientras que la copia de

la célula donadora se reintegra en el cromosoma de la misma. A diferencia de los ICEs, los **Elementos Integrativos y Movilizables** (IMEs) carecen de la maquinaria necesaria para su auto-transferencia por lo que dependen de un elemento conjugativo para su dispersión y se integran también por recombinación específica de sitio. Entre estos últimos, se encuentran las islas genómicas SGI-1 (*Salmonella* Genomic Island 1) del serotipo Typhimurium y otros serotipos de *Salmonella* (Boyd *et al.*, 2000; 2001) y SGI-4 de la variante monofásica de Typhimurium (Branchu *et al.*, 2019). En ambos casos se trata de ICEs que contienen genes de resistencia a antibióticos y/o metales pesados.

1.6. Epidemiología

De acuerdo con el último informe publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, “European Food Safety Authority”), el género *Salmonella* es una de las causas bacterianas de enfermedad gastrointestinal en humanos más frecuente en la Unión Europea (EU), sólo por detrás del género *Campylobacter*. En 2019 se notificaron un total de 87.923 casos confirmados de salmonelosis humana. Los casos notificados muestran que después de un período de tendencia a la baja que se inició en 2008, la incidencia se ha mantenido estable durante el periodo 2014-2019 (EFSA, 2018; 2020). Como en años anteriores, en 2019 los tres serotipos más frecuente fueron Enteritidis (50,3%), seguido de Typhimurium (11,9%) y de la variante monofásica 4,[5],12:i:- del serotipo Typhimurium (8,2%). Entre los 10 serotipos más frecuentes también se encuentran Infantis (4ª posición) y Kentucky (8ª posición) (14ª posición) que, junto con la variante monofásica de Typhimurium fueron abordados en este trabajo, al igual que otros menos frecuentes como son Bredeney (30ª posición), Corvallis (42ª posición) y Kedougou (50ª posición) (EFSA, 2020).

A nivel nacional, en 2018 se notificaron un total de 8.730 casos de salmonelosis causada por serotipos no tifoideos. Los datos recogidos muestran un ligero descenso del número de casos registrados respecto a años anteriores, siendo también Enteritidis el serotipo más frecuente, seguido de Typhimurium y de la variante monofásica (Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación, 2020).

Las técnicas de tipificación tradicionales son útiles en la vigilancia, seguimiento y control de bacterias patógenas transmitidas por alimentos, particularmente las implicadas en brotes, ya que permiten conocer la relación existente entre aislamientos, identificar reservorios y determinar las vías de transmisión. Tradicionalmente estas técnicas se clasifican en fenotípicas, como es el caso de la fagotipificación y la determinación del perfil de resistencia, y genotípicas, entre las que destacan el MLST que, en base a combinación de alelos correspondientes a siete genes *core*, permite obtener la secuencia tipo (ST; “Sequence Type”; <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>), o la electroforesis en campo pulsado (PFGE;

Pulsed-Field Gel Electrophoresis”). Esta última ha sido adoptada como la técnica de tipificación de referencia por PulseNet Internacional (<http://www.pulsenetinternational.org/>) para la tipificación de patógenos transmitidos por alimentos, debido a su reproducibilidad y elevado poder de discriminación. Sin embargo, a comienzos del siglo XXI se desarrollaron nuevos métodos de secuenciación masiva, rápidos y automatizados cuyo precio ha disminuido considerablemente en los últimos años. Por ello, la secuenciación completa de genomas se está convirtiendo en una importante herramienta para las investigaciones epidemiológicas, en lo que se conoce como epidemiología genómica. El MLST del genoma *core* (cgMLST) y los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) son los métodos de tipificación basados en genomas completos más utilizados (ECDC, 2015).

1.6.1. Variante 4,[5],12:i:- del serotipo Typhimurium

Como se comentó anteriormente, *Salmonella* 4,[5],12:i:- representa la tercera causa de salmonelosis tanto en España como en la Unión Europea (EFSA, 2019). Se trata de una variante monofásica del serotipo Typhimurium aunque a efectos de seguimiento epidemiológico se considera un serotipo independiente. Esta variante carece de la flagelina, y por tanto de los antígenos flagelares, de segunda fase, que dependen de la expresión de los genes *hin*, *fljA* y *fljB* (ver apartado 1.2.2). La primera descripción de esta variante tuvo lugar en España en la década de 1990s, asociada a ganado porcino y sus productos (Echeita *et al.*, 1999). Desde entonces, ha sido descrita en numerosos países de Europa, Estados Unidos (EEUU), América latina, Asia y África (EFSA, 2010).

Estudios moleculares apoyan que los aislamientos monofásicos se originaron a partir de aislamientos bifásicos del serotipo Typhimurium, ya que contienen una copia de la secuencia de inserción IS200, específica de este serotipo. Los aislamientos 4,[5],12:i:- estudiados hasta el momento se distribuyen en cuatro líneas clonales o clones mayoritarios denominados español, europeo, sud-europeo y americano (Echeita *et al.*, 1999; Soyer *et al.*, 2009; Switt *et al.*, 2009; Mourao *et al.*, 2014). Dichos clones se diferencian entre sí en cuanto al fagotipo predominante, la ST, los perfiles de resistencia y los elementos genéticos donde se localizan los genes implicados (cromosoma y/o plásmidos), así como en los perfiles PFGE. Además, también se han descrito diferencias en cuanto a los mecanismos responsables del fenotipo monofásico. Todo ello sugiere que estos clones han surgido en eventos evolutivos independientes, de modo que no comparten un antecesor común (Soyer *et al.*, 2009). El **clon español**, detectado por primera vez en España en la década de los 90s, parece estar circulando mayoritariamente en la Península Ibérica. Los aislamientos de este clon pertenecen mayoritariamente al fagotipo U302, aunque también se han descrito DT208 y DT193, y se asignan a la ST19. Son resistentes a un número elevado de antibióticos: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomina,

sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprim (Echeita *et al.*, 1999; 2001; Guerra *et al.*, 2000; 2001; de la Torre *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2011; García *et al.*, 2011; 2013). Los genes responsables de dichas resistencias [*bla*_{TEM-1B}, *cmlA1*, *aac(3')-IV*, *aadA2*, *sul1*, *tet(A)* y *dfrA12*] se localizan en plásmidos de gran tamaño (110 a 220 Kb) pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncC (inicialmente descrito como IncA/C) ± IncN, que pueden portar o no genes del operón *spv* (*spvRABCD*) junto con otros genes del plásmido de virulencia pSLT (Guerra *et al.*, 2001; 2004; García *et al.*, 2011). El primer plásmido del clon español descrito, pUO-STmRV1 se encontró en un aislamiento de Asturias (LSP 389/97), utilizado como representante del grupo (Guerra *et al.*, 2001; García *et al.*, 2011). El fenotipo monofásico del clon español se debe a deleciones que afectan a los genes *fljA*, *fljB* y *hin* provocadas por la inserción de una copia de IS26 en esta región (Garaizar *et al.*, 2002; Laorden *et al.*, 2010; García *et al.*, 2013). Por el momento se han identificado cuatro deleciones diferentes. Todas ellas comienzan en el mismo sitio, dentro del gen STM2758 (siguiendo nomenclatura utilizada para la anotación del genoma de *S. Typhimurium* LT2; número de acceso NC_003197) pero terminan en distintas posiciones (Laorden *et al.*, 2010; García *et al.*, 2013).

Al igual que el clon español, el **clon sud-europeo** presenta la secuencia tipo ST19 y resistencia plasmídica a un número elevado de antibióticos, incluyendo cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclina. Los genes responsables se localizan en plásmidos del grupo de incompatibilidad IncR, de entre 80 a 160 Kb, que contienen también genes de virulencia, incluido el locus *spv*. Este clon fue detectado en diversos países del sur de Europa, en concreto España, Italia y Portugal, de ahí su nombre (García *et al.*, 2014; Mourão *et al.*, 2014). Además de los pertenecientes a este clon, se han descrito otros aislamientos monofásicos ST19 multirresistentes, portadores de plásmidos derivados de pSLT (IncFII+IncFIB) donde se encuentran genes de virulencia junto con genes de resistencia a diversos antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y trimetoprim (García *et al.*, 2014).

El **clon europeo** fue detectado por primera vez en 1998, siendo desde 2005 el clon monofásico mayoritario a nivel mundial. Se asigna a ST34 siendo DT193 y DT120 los fagotipos predominantes. Presenta resistencia frente a ampicilina, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas gracias a los genes *bla*_{TEM-1B}, *strAB*, *sul2* y *tet(B)*. Estos genes se localizan, junto con el locus *mer* de resistencia a mercurio y varias copias de la secuencia de inserción IS26, en una región de resistencia (RR) cromosómica, que puede incluir uno o dos módulos (Hopkins *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2010; Antunes *et al.*, 2011; García *et al.*, 2016; Boland *et al.*, 2015). El clon europeo contiene, además, la isla genómica SGI-4, un ICE donde se localizan genes implicados en la homeostasis del cobre y plata (CHASRI, ver apartado 1.5.3.2) y un operón de resistencia a arsénico (Petrovska *et al.*, 2016; Arai *et al.*, 2018; Branchu *et al.*, 2019; Mourão *et*

al., 2020). Al igual que en el clon español, el fenotipo monofásico del clon europeo se asocia a la ausencia de los genes *fljA*, *fljB* e *hin*, pero, a diferencia del anterior, las deleciones siempre comienzan dentro de una *orf* situada entre *hin* e *iroB* afectando a un número diferente de *orfs* por el otro extremo. Las deleciones se encuentran asociadas bien a una copia de IS26 (Lucarelli *et al.*, 2012) o bien a la región RR flanqueada por dos copias de esta secuencia de inserción (Boland *et al.*, 2015; García *et al.*, 2016). Finalmente, el **clon americano**, con secuencia tipo ST19, apareció en torno al año 2004 (Switt *et al.*, 2009). En este caso, el fenotipo monofásico fue provocado por una deleción de gran tamaño que afecta a los genes *fljA* y *fljB* pero no al gen *hin* (Soyer *et al.*, 2010). Este patrón de deleción coincide con el descrito para el clon sud-europeo, por lo que podrían estar evolutivamente relacionados (Mourão *et al.*, 2014). Sin embargo, los aislamientos del clon americano carecen de plásmidos IncR y en su mayoría son sensibles, siendo muy infrecuente la multirresistencia (Switt *et al.*, 2009).

1.6.2. Otros serotipos

Como se comentó anteriormente, los serotipos Enteritidis, Typhimurium y la variante monofásica de Typhimurium son responsables de la mayoría de los casos de infección por NTS. Sin embargo, se han detectado aislamientos de otros serotipos cuyo interés en este trabajo reside en la resistencia frente a cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas y/o colistina. Algunos se asignaron a clones emergentes de los serotipos Infantis y Kentucky, mientras que otros fueron aislamientos esporádicos de los serotipos minoritarios Bredeney, Corvallis, Kedougou y Paratyphi B biovariedad Java.

En cuanto al **serotipo Infantis**, varios estudios revelan la diseminación de un clon emergente ST32, cuya principal vía de transmisión son los pollos de engorde, pudiendo pasar a humanos a través de la cadena alimentaria. La mayoría de los aislamientos de este clon son resistentes a cefalosporinas de amplio espectro, cefoxitina, ciprofloxacino, tetraciclina, sulfonamidas y trimetoprim (Clockaert *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2015; Acar *et al.*, 2019). Recientemente, se han descrito aislamientos ST32 portadores de genes que confieren resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (*bla*_{CTX-M-65}) relacionados con la presencia de un plásmido emergente denominado pESI surgido por recombinación de plásmidos IncII e IncP ancestrales (Aviv *et al.*, 2014; García-Soto *et al.*, 2020). Este plásmido, de unas 280 Kb, fue detectado inicialmente en Israel y contiene genes de resistencia a tetraciclinas, sulfonamidas, trimetoprim y mercurio y genes que codifican para la producción del sideróforo yersiniabactina. Los aislamientos del clon presentan también a resistencia a quinolonas y nitrofurantoína, debido a mutaciones cromosómicas en los genes *gyrA* y *nfsA*, respectivamente (Aviv *et al.*, 2014). Por otro lado, en torno a 1989 surgió en Egipto el clon multirresistente ST198 del **serotipo Kentucky**, asociado a la adquisición de la isla genómica SGII-K que confiere resistencia a

ampicilina, gentamicina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclinas (Le Hello *et al.*, 2013a; Hawkey *et al.*, 2019). A continuación, el clon multirresistente ST198, portador de SGI1-K, acumuló de manera secuencial varias mutaciones en las QRDRs de los genes *gyrA* y *parC*. En conjunto, estas mutaciones son responsables de la resistencia a fluoroquinolonas, que precedió a la expansión del clon desde Egipto a muchas otras áreas geográficas, entre las que se incluye Europa (Le Hello *et al.*, 2011; Hawkey *et al.*, 2019). En Europa, las infecciones en humanos se asocian principalmente con viajes a países de África, Oriente Medio y Asia

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. The largest set is at the top, a medium-sized set is in the middle, and a large set is at the bottom right. Two thin, dark pink lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom right circle.

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

*“La ciencia es más que un simple conjunto de
conocimientos: es una manera de pensar”*
(Carl Sagan)

La enorme repercusión de *S. enterica* en salud pública junto con el aumento de la resistencia y el posible papel de esta especie como agente de transmisión de genes de resistencia a otras bacterias ha justificado su inclusión en el Plan de Acción Global sobre la resistencia a los antimicrobianos (GLASS, Global Antimicrobial Surveillance System), puesto en marcha por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015. Justifica, además, la estrecha vigilancia a que está siendo sometida por parte de la UE, a través de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) y del ECDC (Centro Europeo para el Control de Enfermedades), que orientan y coordinan los esfuerzos de los Estados Miembros, incluida España, en su lucha contra los agentes patógenos y la resistencia a los antibióticos.

En este contexto, la Tesis Doctoral se centró en el estudio experimental y genómico de aislamientos de *S. enterica* pertenecientes mayoritariamente a la variante monofásica de Typhimurium, dada su elevada incidencia a nivel mundial, pero también a otros serotipos. Los aislamientos analizados se obtuvieron de muestras clínicas en diversos hospitales del Principado de Asturias y de otras comunidades del norte de España, así como de muestras de alimentos del Principado de Asturias. Se prestó especial atención a los aislamientos multirresistentes o con resistencias a antibióticos considerados por la OMS “de importancia crítica y máxima prioridad en medicina humana”.

De acuerdo con ello, los objetivos abordados fueron los siguientes:

- ✚ **Objetivo 1.** Realizar el seguimiento epidemiológico de los clones español, sud-europeo y europeo de la variante monofásica de Typhimurium detectados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018, tanto en muestras clínicas como en alimentos.
- ✚ **Objetivo 2.** Llevar a cabo la tipificación, la determinación de la susceptibilidad a antibióticos y la identificación de genes y elementos genéticos que pudieran haber contribuido al éxito alcanzado por los clones monofásicos, utilizando para ello técnicas experimentales y análisis genómico.
- ✚ **Objetivo 3.** Profundizar en el estudio de aislamientos monofásicos con resistencias a antibióticos de gran relevancia en medicina humana (cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas, fluoroquinolonas y colistina) procedentes tanto de muestras clínicas como de alimentos.
- ✚ **Objetivo 4.** Establecer relaciones filogenéticas inter e intra-clon, en base a SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) localizados en el genoma *core*.
- ✚ **Objetivo 5.** Caracterizar aislamientos con resistencias relevantes pertenecientes a otros serotipos de *S. enterica*, utilizando para ello técnicas experimentales, análisis genómico y análisis filogenético.

La Tesis Doctoral se realizó en el marco del proyecto FIS PI17/00474: “Serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica* con resistencias emergentes y/o multirresistentes en la cornisa cantábrica: Análisis genómico y capacidad de dispersión de la resistencia”.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. The largest set is at the top, a medium-sized set is in the middle, and a large set is at the bottom right. Two thin, dark pink lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom right circle.

MATERIAL Y MÉTODOS

*“No se puede enseñar nada a un hombre, sólo se le
puede ayudar a descubrirse a sí mismo”*
(Galileo Galilei)

3.1. Procedencia de los aislamientos de *Salmonella*

3.1.1. Aislamientos de origen clínico

La mayoría de los aislamientos analizados en este trabajo corresponden al periodo 2008-2018 y son de origen clínico. Fueron cedidos por el Laboratorio de Salud Pública (LSP) del Principado de Asturias (PA), procedentes muestras clínicas recogidas en diversos hospitales de las áreas sanitarias de la región: Hospital de Jarrío (HJ), área I, Jarrío; Hospital Público Carmen y Severo Ochoa (HPCSO), área II, Cangas de Narcea; Hospital Universitario San Agustín (HUSA), área III, Avilés; Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Hospital Monte Naranco (HMN) y Clínica Asturias (CA), área IV, Oviedo; Hospital Universitario de Cabueñes (HUC), Fundación Hospital Jove (FHJ) y Hospital Covadonga (HCov), área V, Gijón; Hospital de Arriendas (HA), área VI, Arriendas; Hospital Vital Álvarez Buylla (HVAB), área VII, Mieres; y Hospital Valle del Nalón (HVN), área VIII, Riaño, así como de hospitales de Cantabria: Hospital Universitario Marqués de Valdecillas (HUMV) y del País Vasco: Hospital Universitario de Donostia (HUD) y Hospital Universitario de Álava (HUA).

En primer lugar, se analizaron 615 aislamientos pertenecientes a la variante monofásica 4,[5],12:i:- de Typhimurium detectados en hospitales de Asturias durante el periodo 2008-2018 (Anexo I). La mayoría de los aislamientos se obtuvieron de heces (589) pero también de orina (11) sangre (8) o pus (1). Dos aislamientos fueron detectados tanto en heces como en sangre del mismo paciente y cuatro son de origen desconocido. Además, se caracterizaron otros cuatro aislamientos monofásicos obtenidos en 2020 a partir de diferentes muestras de un mismo paciente ingresado en el HUCA: sangre (2), heces (1) y aspirado traqueal (1). Finalmente, para su análisis genómico también se recuperaron otros 27 aislamientos monofásicos de origen clínico (heces), anteriores a 2008, que ya habían sido caracterizados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (Guerra *et al.*, 2000; 2001; P. García, 2013 Tesis Doctoral).

En segundo lugar, se analizaron un total de 25 aislamientos detectados durante el periodo 2008-2018 en los hospitales de Cantabria: HUMV (4) y País Vasco: HUA (4) y HUD (17) (Anexo II). Estos aislamientos, pertenecientes a diferentes serotipos: 4,[5],12:i:- (8), Typhimurium (2), Kentucky (8), Infantis (2), Bredeney (2), Corvallis (2) y Paratyphi B (1), fueron seleccionados en base a la resistencia frente a antibióticos de gran importancia en medicina humana, como son las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas. La información obtenida llevó a ampliar el estudio epidemiológico en el PA, añadiéndose 57 aislamientos clínicos pertenecientes a algunos de los serotipos con resistencias relevantes encontrados en los hospitales de las otras comunidades autónomas (Anexo III). En concreto, se analizaron todos los aislamientos clínicos registrados por el LSP, pertenecientes a Paratyphi B

(45), Kentucky (5), Corvallis (6) y Kedougou (1). Estos aislamientos se obtuvieron de muestras de heces (54) y sangre (3).

La fórmula antigénica de todos los aislamientos de origen clínico cedidos por el LSP fue determinada experimentalmente por el Centro Nacional de Microbiología (CNM, Madrid), que también se encargó de establecer el fagotipo hasta mediados del año 2017, desconociéndose el dato a partir esa fecha. El serotipo de los demás aislamientos fue determinado “in silico”, mediante análisis bioinformático de los genomas secuenciados.

3.1.2. Aislamientos de alimentos

Todos los aislamientos procedentes de alimentos analizados en este trabajo fueron cedidos por el LSP, donde se obtuvieron durante el periodo 2008-2018 en el marco de la contribución española al cumplimiento de la “Commission implementing decision 2013/652/EU”, sobre la monitorización y reporte de la resistencia a antibióticos en bacterias zoonóticas y comensales (European Commission, 2013). En total fueron 128 de los cuales 126 correspondieron a la variante monofásica de Typhimurium (Anexo IV) y los 2 restantes a otros serotipos (Anexo V), incluyendo aquellos que habían presentado resistencias relevantes en el apartado anterior: Paratyphi B (1) y Kedougou (1). La determinación experimental del serotipo fue llevada a cabo en la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). Las muestras de alimentos a partir de las que se obtuvieron fueron las siguientes: superficies de canales porcinas, bovinas o sin especificar el animal de procedencia (3, 4 y 21, respectivamente), carne picada (6), picadillo sin especificar el animal de procedencia (28), huevos frescos (1), productos cárnicos y derivados (24 y 36, respectivamente). Cinco de los aislamientos fueron de origen desconocido.

3.1.3. Aislamientos utilizados como control

Adicionalmente, se utilizaron otros aislamientos de *S. enterica* como controles positivos o negativos en diferentes experimentos, los cuales se indicarán en los apartados correspondientes.

3.2. Medios de cultivo y conservación de los aislamientos

Los medios de cultivo empleados durante la realización de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

Agar Eosina-Azul de Metileno (EMB), medio sólido selectivo y diferencial cuya composición incluye 10 g/l de peptona, 2 g/l de fosfato de hidrógeno dipotásico, 15 g/l de agar,

0,4 g/l de eosina Y, 0,06 g/l de azul de metileno y 10 g/l de lactosa (pH 6,8). Preparado según las instrucciones del fabricante (Oxoid, Madrid, España).

Caldo Luria Bertani (LB), medio líquido cuya composición es la siguiente: 10 g/l triptona, 10g/l NaCl y 5 g/l (pH 7).

Agar Luria Bertani (LA), medio sólido preparado a partir de LB mediante la adición de agar al 2% p/v.

Mueller-Hinton (MH), medio sólido comercial (Oxoid, Madrid, España) que consta de 17,5 g/l de caseína ácida hidrolizada, 300 g/l de extracto de carne, 1,5 g/l de almidón y 17 g/l de agar (pH 7,3). Preparado según las instrucciones del fabricante.

Caldo Mueller-Hinton 2 ajustado en cationes, medio líquido comercial (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) cuya composición es: 17,5 g/l de hidrolizado ácido de caseína, 3 g/l de extracto de carne y 1,5 g/l de almidón (pH 7,3). Preparado según las instrucciones del fabricante.

Medio SuperPolymixin, medio sólido específico para la búsqueda de aislamientos Gram negativos resistentes a polimixinas, que consiste en medio comercial EMB suplementado con sulfato de colistina (20 mg/ml), daptomicina (20 mg/ml) y anfotericina B (20 mg/ml).

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 min. Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con uno o más antibióticos (Sigma-Aldrich, Madrid, España): ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), estreptomycin (40 µg/ml), gentamicina (10 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), rifampicina (50 µg/ml), sulfacidina (300 µg/ml), tetraciclina (30 µg/ml), trimetoprim (10 µg/ml), cefotaxima (8 µg/ml) y/o colistina (3,5 µg/ml).

Para la conservación de los aislamientos a largo plazo, se recogió con un asa de siembra un inóculo procedente de una placa de antibiograma (medio MH) y se transfirió a caldo LB con glicerol al 20%. La mezcla se almacenó a -20°C o -80°C.

3.3. Análisis fenotípico de la resistencia/susceptibilidad a antibióticos

La sensibilidad/resistencia a agentes microbianos de los aislamientos se estableció utilizando el método de difusión disco-placa (o de Kirby Bauer) y/o mediante determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), siguiendo las normas y criterios establecidos por el “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI; CLSI, 2019) o “The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST; https://eucast.org/clinical_breakpoints/).

3.3.1. Técnica de difusión disco-placa

La **técnica de difusión disco-placa** se llevó a cabo medio MH. Para ello se partió de cultivos de una noche a 37°C en agitación (2.600 rpm) en 2,5 ml de LB. Se sembraron 100 µl de una dilución 1/100 del cultivo de cada aislamiento sobre la superficie de tres placas de MH, extendiéndolo hasta conseguir una distribución homogénea con ayuda de un hisopo estéril. A continuación, se colocaron discos comerciales (Oxoid, Madrid, España), impregnados con los distintos antibióticos, sobre la superficie inoculada con ayuda de un dispensador para garantizar la correcta separación de los mismos (unos 25 mm de distancia). Posteriormente, se incubaron durante una noche a 37°C, observando al día siguiente la presencia/ausencia de halo de inhibición (Figura 15) e interpretando los resultados según los criterios establecidos por el CLSI (2019). En todos los casos se ensayó una batería de 21 antibióticos, cuya cantidad en µg se indica entre paréntesis: ácido nalidíxico (30), amikacina (30), amoxicilina- clavulánico (30), ampicilina (10), azitromicina (15), cefepima (30), cefotaxima (30), cefoxitina (30), ciprofloxacino (5), cloranfenicol (30), colistina (10), ertapenem (10), estreptomina (10), fosfomicina (300), gentamicina (10), kanamicina (30), nitrofurantoína (300), sulfonamidas (300), tetraciclina (30), tobramicina (10) y trimetoprim (5). En determinados casos también se utilizó pefloxacino (5), interpretando los resultados de acuerdo con EUCAST (2016).



Figura 15. Antibiograma según el método de difusión disco-placa (Fotografía tomada en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Oviedo).

3.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La CMI se determinó para los antibióticos ácido nalidíxico, ciprofloxacino y colistina, así como para los compuestos derivados de mercurio (HgCl_2), plata (AgNO_3), cobre (CuSO_4), arsénico inorgánico (NaAsO_2 y NaHASO_4) y arsénico orgánico (roxarsone, fenilarsenito y trifenilarsenito). Para ello se utilizaron los medios LB o caldo MH ajustado en cationes y placas de microtiter comerciales de 96 pocillos (con 8 filas y 12 columnas; Figura 16), estériles y con tapa (Dismed, Gijón, España). Cada fila se utiliza para determinar la CMI de una bacteria a un determinado compuesto. Al primer pocillo de cada columna se añaden 100 μl de la disolución stock del compuesto, preparada a una concentración cuatro veces superior (x4) a la más alta que se quiere ensayar (Tabla 6). En cada uno de los demás pocillos se reparten 50 μl del medio líquido. A continuación, se añaden 50 μl de la disolución 4x del primer pocillo al segundo pocillo, se mezcla bien y se pasan 50 μl al siguiente pocillo de la misma fila y así sucesivamente hasta el pocillo número 10 (de este último se retiran 50 μl , para igualar el volumen a 100 μl). Así, en cada paso, la concentración del compuesto se diluye a la mitad. Este proceso se repite para cada fila y, por último, se añaden 50 μl del inóculo de la bacteria correspondiente a cada una de ellas. El inóculo se prepara a partir de colonias aisladas obtenidas en medio sólido MH y resuspendidas en agua estéril hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 McFarland. A continuación, se realiza una dilución 1/100 del inóculo ajustado y se utilizan 50 μl de esta última como se indicó anteriormente (Figura 16). Los últimos dos pocillos, que carecen del compuesto, son empleados como control positivo de crecimiento y como control negativo. El control positivo consta de 50 μl de medio y 50 μl de cultivo mientras que el control negativo solo contiene 50 μl de medio. Finalmente, las placas cerradas se incuban durante una noche a 37°C, tras la cual los resultados fueron interpretados acorde a los criterios establecidos por el CLSI (2019) o por el EUCAST (2016) en el caso de la colistina.

Tabla 6. Concentraciones ensayadas para el cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de diversos agentes antimicrobianos.

Antimicrobiano ^a	Concentración mínima	Concentración máxima
Colistina	0,125 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$
Ácido nalidíxico	0,016 $\mu\text{g/ml}$	256 $\mu\text{g/ml}$
Ciprofloxacino	0,002 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$
HgCl_2	2 $\mu\text{g/ml}$	1.024 $\mu\text{g/ml}$
AgNO_3	0,0039 mM	2 mM
CuSO_4	0,5 mM	12 mM
NaAsO_2	64 $\mu\text{g/ml}$	32.768 $\mu\text{g/ml}$
NaHASO_4	64 $\mu\text{g/ml}$	32.768 $\mu\text{g/ml}$
Fenilarsenito	4 $\mu\text{g/ml}$	2.048 $\mu\text{g/ml}$
Roxarsone	64 $\mu\text{g/ml}$	32.768 $\mu\text{g/ml}$

a, Las CMI del ácido nalidíxico y ciprofloxacino se determinó mediante est. Para todos los demás agentes antimicrobianos se utilizó el método de microdilución en placa.

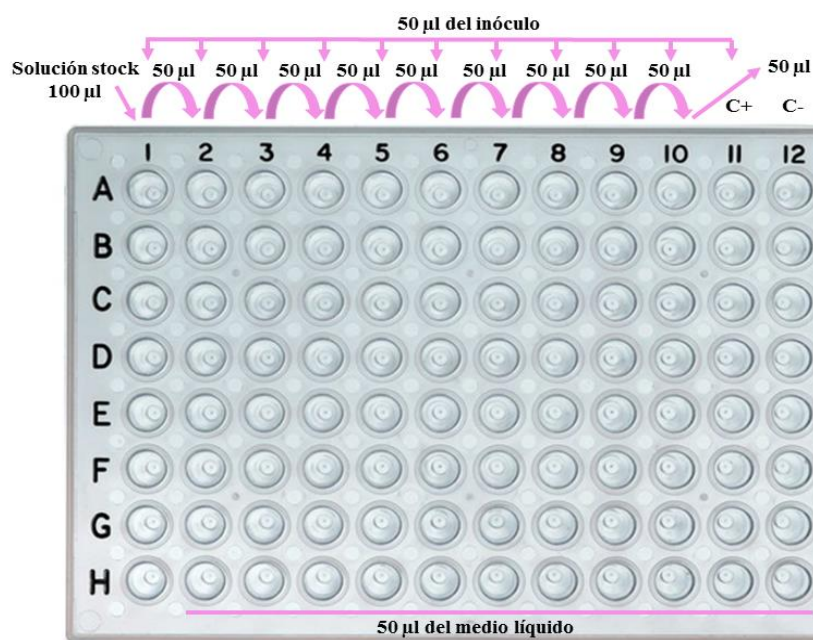


Figura 16. Esquema de la técnica de microdilución en placa. C+, control positivo; C-, control negativo.

Como alternativa, se emplearon otros dos métodos diferentes para determinar la CMI: en el caso del cobre se utilizaron placas de agar MH suplementadas con diferentes concentraciones de CuSO_4 y la incubación se llevó a cabo de forma paralela en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Las condiciones de anaerobiosis se consiguieron incubando las placas en el interior de una jarra cilíndrica de plástico rígido (Oxoid, Madrid, España), cuya tapa se cierra herméticamente. Para conseguir la atmósfera anaerobia se coloca en el interior de la jarra un sobre (Anaerogen; Oxoid, Madrid, España), cuyos componentes absorben el oxígeno a la vez que liberan CO_2 . En el caso del ácido nalidíxico y el ciprofloxacino, las CMI se determinaron mediante tiras Etest (Biomérieux, Madrid, España), que contienen un gradiente predefinido y estable de diferentes concentraciones del antibiótico a ensayar.

3.4. Detección de genes de resistencia y elementos genéticos móviles mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la detección de genes de resistencia; secuencias específicas de elementos genéticos móviles, tales como transposones, integrones y secuencias de inserción; genes implicados en virulencia; y/o genes o regiones localizadas en el cromosoma o en plásmidos que codifican para diversas funciones, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, “Polymerase Chain Reaction”). El ADN utilizado para llevar a cabo la amplificación se obtuvo por dos métodos diferentes: 1) 1,5 µl de una dilución 1/100 de ADN genómico extraído con el kit comercial “Gene Elute Bacterial Genomic DNA Kit” siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemania) o, 2) 1,5-2 µl de ADN liberado a partir de células bacterianas.

En este último caso, se parte de un cultivo de una noche en agitación a 37°C en 2,5 ml de LB. Tras centrifugar 1 ml de este cultivo, el sedimento se resuspende en 300 µl de tampón TE [Tris-HCl 10mM, EDTA (Ácido Étilen Diamino Tetra-Acético) 1mM, pH8] y se hierve a 100°C durante 10 min. A continuación, se centrifuga durante 5 min a 14.000 rpm y se recoge y congela el sobrenadante hasta su utilización para evitar la degradación del ADN liberado.

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación por PCR incluyen los primers o cebadores (oligonucleótidos de unos 20 nucleótidos (nt) de longitud con secuencia complementaria a los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar y que actuarán como iniciadores en las reacciones de síntesis), los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) necesarios para la elongación del producto de la amplificación, el tampón de reacción y la enzima Taq polimerasa. Todo ello, a excepción de los cebadores, se comercializa de manera conjunta en el producto NZTTaq II 2x Green Master (NZYTech, Lisboa, Portugal), cuyos componentes son: dNTPs y tampón en concentraciones adecuadas para la amplificación (no indicadas por la casa comercial), MgCl₂ 2,5 mM y Taq polimerasa 0,2 U/µl.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), en cuyo programa se suceden las distintas etapas del proceso (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de las diferentes etapas de la amplificación por PCR.

Etapas	Condiciones	
Desnaturalización inicial	95°C- 3 min	
Desnaturalización	94°C- 30 seg	
Anillamiento	X°C*- 1 min	30 ciclos
Elongación	72°C	
Elongación final	72°C- 5 min	
Conservación	20°C	

* La temperatura de anillamiento viene determinada por los cebadores utilizados en cada reacción.

En todas las reacciones se incluyeron dos controles negativos: ADN de la cepa sensible *S. Typhimurium* LT2 y control sin ADN, así como controles positivos: ADN de diversas cepas que contienen la(s) secuencia(s) y/o gen(es) rastreados (Tabla 8).

Tabla 8. Cepas bacterianas empleadas como controles negativos y positivos.

Cepa ^a	Plásmidos ^b	Fenotipo ^c /Genotipo ^d	Referencia
LT2 (<i>S. Typhimurium</i>)	pSLT	Sensible/WT	McClelland <i>et al.</i> , 2001
LSP 389/97 (<i>S. Typhimurium</i> monofásica)	pUO-STmRV1	AMP-CHL-[GEN-TOB]-[STR-SPE]-SUL-TET-TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} - <i>cmiA1</i> - <i>acc(3)</i> - <i>IV</i> -[<i>aadA2</i>]-[<i>su1</i> - <i>su2</i> - <i>su3</i>]- <i>tet(A)</i> - <i>dfrA12</i>	García <i>et al.</i> , 2011

(Continuación Tabla 8)

LPS 146/02 (<i>S. Typhimurium</i>)	pUO-StvR2	AMP-CHL-STR-SUL-TET/ <i>bla</i> _{OXA-1} - <i>catA1</i> - <i>aadA1</i> - <i>sul1</i> - <i>tet</i> (B)	Herrero <i>et al.</i> , 2008
LSP 14/92 (<i>S. Typhimurium</i>)	-	AMP-CHL-STR-SULTET/ <i>bla</i> _{PSE-1} - <i>floR</i> - <i>aadA2</i> - <i>sul1</i> - <i>tet</i> (G)	Herrero <i>et al.</i> , 2006
FV 8010 (<i>Escherichia coli</i>)	ind	AMP-TIC-AMP/SAM-NAL-MIN-COL/ <i>mcr-4</i> - <i>mcr-5</i>	García <i>et al.</i> , 2018
FV 15919 (<i>Escherichia coli</i>)	ind	AMP-TIC-GEN-TOB-SXT-NAL-MIN-COL/ <i>mcr-1</i> - <i>mcr-5</i>	García <i>et al.</i> , 2018
C516 (<i>S. Virchow</i>)	335 Kb (NT)	AMP-CTX-NAL-KAN-STR-SUL-TET-TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1B} - <i>bla</i> _{CTX-M-9} - <i>ni-aph</i> (3')-I-[<i>aadA2</i> - <i>strA</i> - <i>strB</i>]-[<i>sul1</i> - <i>sul2</i>]- <i>tet</i> (A)- <i>dfrA16</i>	de Toro <i>et al.</i> , 2013

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, ind, información no disponible; NT, no tipificable.

c, AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol, COL, colistina; CTX, cefotaxima, GEN, gentamicina; GM, gemifloxacina; SPE, espectomicina, STR, estreptomicina, SUL, sulfonamida; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; TMP, trimetoprim; AMP/SAM, ampicilina sulbactam; SXT, Trimetoprim sulfametoxazol; TIC, ticarcilina; MIN, minociclina.

d, WT, “Wild Type”; ni, no identificado. En el caso de *E. coli* solamente se conocen los genes de resistencia a colistina.

Los cebadores empleados se recogen en los anexos VI y VII. La mayor parte de las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas fueron obtenidas de diferentes fuentes bibliográficas. Sin embargo, en algunos casos fue necesario su diseño en base a secuencias disponibles (anexo VII), utilizando para ello el programa informático Clone Manager (CloneSuit9). En todos los casos la síntesis de los oligonucleótidos fue llevada a cabo por la compañía Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania).

Los fragmentos obtenidos como producto de la amplificación, también llamados amplicones, se separaron en función de su tamaño mediante electroforesis convencional. Para ello se cargaron en geles de agarosa (1-2% p/v) que fueron sometidos a 120V durante 30 min en cubetas de electroforesis que contienen tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Como marcadores de tamaño molecular se emplearon el ADN del fago λ digerido durante 12 h a 37°C con el enzima de restricción PstI (Takara Biomedicals, Saint-Germain-en-Laye, Francia) o el marcador comercial NZYDNA Ladder III (NZYTech, Lisboa, Portugal). Antes de la electroforesis, se añaden 2-3 μ l de GreenSafe Premium (NZYTech, Lisboa, Portugal) a la agarosa fundida y enfriada a 55°C, aproximadamente, se mezcla hasta que el aspecto de la agarosa sea homogéneo y se deja solidificar el gel. Este compuesto actúa como agente intercalante en el ADN permitiendo visualizar los amplicones en un transiluminador de luz ultravioleta incorporado al sistema de captación de imágenes Gel Doc™ XR System (Bio-Rad, Madrid, España).

3.5. Técnicas de tipificación

3.5.1. Macrorrestricción genómica con XbaI seguida de electroforesis en campo pulsante

Esta técnica se basa en el análisis del polimorfismo de los fragmentos obtenidos al llevar a cabo la digestión del ADN genómico con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte (como XbaI en el caso de *Salmonella*). Estas enzimas generan un número reducido de fragmentos de diferentes tamaños (entre 10 y 10.000 Kb; Nassonova, 2008), que son separados posteriormente mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis). Es una técnica altamente reproducible y con elevado poder de discriminación. Por ello, constituye uno de los métodos de referencia en estudios epidemiológicos de brotes causados por bacterias como *Samonella*. En este trabajo se llevó a cabo el protocolo estandarizado de la red PulseNet (<http://www.pulsenetinternational.org/>) para *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*, que consta de las siguientes etapas (Figura 17):

Cultivo de aislamientos. Siembra en placas con medio LA a partir de una colonia aislada e incubación a 37°C durante una noche.

Inclusión de las bacterias en bloques de agarosa. Esta etapa tiene como objetivo evitar la degradación del ADN durante la extracción, por lo que resulta clave en la obtención del ADN intacto. Se prepara una suspensión celular en tampón “Cell Suspension Buffer” (CBS; Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8), ajustando la densidad óptica a 610 nm entre 0,8-1. Una vez ajustada, se añade a cada suspensión proteinasa K (Roche Diagnostics, Barcelona, España) a una concentración final de 0,5 mg/ml y se mezcla en relación 1:1 con agarosa al 1% (p/v) (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bio Science, Rockland, Inc., USA) y SDS al 1% en tampón TE, atemperados a 50°C. Esta mezcla se distribuye en moldes de 12 x 15 mm y se deja solidificar a temperatura ambiente o en la nevera.

Lisis celular. Se transfieren los bloques a tubos que contienen 5 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, sarcosina 1%, pH 8) y proteinasa K a una concentración final de 0,1 mg/ml, y se incuban en un baño con agitación durante 2 h a 55°C. Estos compuestos garantizan la lisis celular y la eliminación de enzimas que podrían degradar el ADN.

Lavado de los bloques. Transcurridas las dos horas se desecha el tampón de lisis y se realiza un total de 6 lavados secuenciales de 15 min a 50°C y en agitación. Los dos primeros se llevan a cabo con agua estéril atemperada a 50°C y los 4 siguientes con tampón TE atemperado a la misma temperatura. Realizados los lavados, los bloques pueden utilizarse directamente o almacenarse en TE estéril a 4°C.

Digestión del ADN liberado en los bloques. Se cortan los bloques en secciones de 2 a 2,5 mm de grosor y se tratan con 50 U de XbaI (EURx, Gdansk, Polonia) durante 4 h a 37°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Electroforesis. Una vez finalizada la digestión del ADN, se lleva a cabo la separación de los fragmentos obtenidos PFGE utilizando geles de agarosa (Ultra Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad, Madrid, España) al 1% (p/v) en tampón TBE (Tris-Borato 45 mM, pH 8, EDTA 1mM). Como control del tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó el ADN de la cepa de referencia Braenderup H9812 también digerida con XbaI (Hunter *et al.*, 2005). La electroforesis fue llevada a cabo empleando el aparato CHEF-DR III (Bio-Rad, Madrid, España) y los parámetros establecidos para *Salmonella*, que son los siguientes: 6 V/cm, ángulo de 120° y 20 h de corrido con una rampa de 2,2 a 63,8 seg a 14°C de temperatura. Una vez finalizado este tiempo, los geles se tiñen utilizando una solución acuosa de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) y se visualizan como se describió para la electroforesis convencional (apartado 3.4).

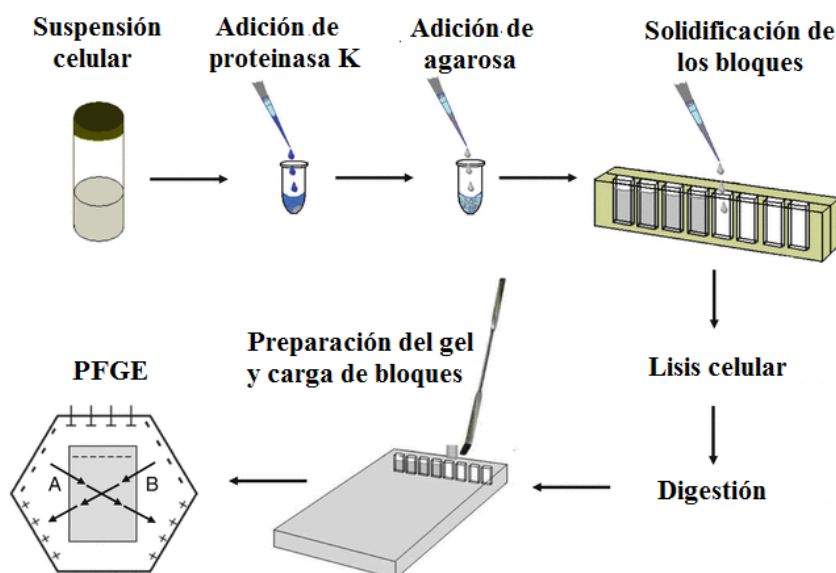


Figura 17. Etapas del protocolo de electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Modificada de Hu y Manos, 2015)

Análisis de los perfiles PFGE. Para establecer la relación entre los perfiles obtenidos se construyó un dendograma de similitud mediante el software BioNumerics versión 6.6 (Applied Maths, NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica), a través del algoritmo “Underweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages” (UPGMA), utilizando el coeficiente de similitud de Dice con un valor de tolerancia del 1% y un valor de optimización del 1,5%. Dicho coeficiente indica la probabilidad de que una banda presente en un perfil se encuentre también en otro. Finalmente, los perfiles de fragmentos establecidos fueron designados con la letra X seguida de un número que identifica cada perfil diferente (Xn).

3.6. Análisis de plásmidos

3.6.1. Extracción y visualización de plásmidos

La obtención y visualización de plásmidos fue llevada a cabo mediante dos métodos complementarios.

KADO. La presencia de plásmidos en los aislamientos bacterianos estudiados se puso de manifiesto mediante el método de lisis alcalina propuesto por Kado and Liu (1981), el cual permite la extracción y posterior visualización no solo de plásmidos pequeños sino también de gran tamaño. A partir de un cultivo bacteriano en 2,5 ml de LB, incubado durante una noche a 37°C en agitación, se obtuvo el sedimento mediante centrifugación, el cual fue resuspendido en la solución KD-I (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La lisis celular tuvo lugar por acción de detergente tras la adición de la solución KD-II (NaOH 2N, Tris-HCl 1M, SDS 3% (p/v), pH 12,5), y su posterior incubación en un baño a 55°C durante 30 min. Finalmente, la purificación del ADN plasmídico se consigue por adición de fenol ácido (equilibrado con agua)-cloroformo/iso-amino-alcohol (48:2). Tras obtener una mezcla homogénea y centrifugar, se recoge la fase acuosa superior, la cual contiene el ADN plasmídico, separado del ADN cromosómico, las proteínas y demás restos celulares. Para su visualización, se cargan 20 µL de la fase acuosa en un gel de agarosa al 0,6% (p/v en tampón TAE) y se someten a electroforesis convencional en el mismo tampón durante 3 h a 120 V. La fase acuosa restante se puede conservar a 4°C. La visualización tuvo lugar del modo indicado en el apartado 3.4. Como controles del tamaño de los plásmidos intactos, se utilizaron plásmidos procedentes de las cepas control: *Escherichia coli* 92 V517 (NCTC50192) (de 150 Kb, 65 Kb, 37 Kb y 7 Kb; Threlfall *et al.*, 1986) y *E. coli* 93 39R861 (NCTC50193) (de 49,2 Kb, 8 Kb, 5,3 Kb y 4,6 Kb; Macrina *et al.*, 1978). Este método permite visualizar plásmidos cuyo tamaño se encuentra entre unas pocas Kb y hasta unas 200 Kb.

S1. Para visualizar plásmidos de gran tamaño (>200 Kb) se utilizó el tratamiento con la nucleasa S1, cuya actividad sobre el ADN bicatenario permite la conversión de plásmidos super-enrollados en fragmentos lineales. Para ello, las células bacterianas de cada aislamiento fueron embebidas en bloques de agarosa y lisadas del modo indicado en el apartado 3.5.1. A continuación, el ADN fue digerido con 7 U del enzima S1 (EURx, Gdansk, Polonia) durante 30 min a 37°C, siguiendo las instrucciones del protocolo de Barton *et al.* (1995). Transcurrido el tiempo, la digestión fue detenida mediante la adición de EDTA 0,2 M y a continuación se realizó la PFGE. Como control de tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó el ADN de la cepa control Braenderup H9812 digerido con XbaI.

3.6.2. Tipificación de plásmidos

Los grupos de incompatibilidad de los plásmidos detectados en esta tesis se identificaron utilizando el método de tipificación “PCR-Base Replicon Typing” (PBRT) descrito por Carattoli *et al.* (2005), el cual permite identificar la mayor parte de los llamados plásmidos epidémicos que se encuentran circulando en los miembros del orden *Enterobacteriales*.

Este método consiste en la amplificación por PCR de secuencias específicas implicadas en la replicación plasmídica o en su control. Comprende 5 PCR múltiples y 3 PCR simples, que incluyen los replicones de los 18 grupos de incompatibilidad principales: HI1, HI2, I1- $\alpha\gamma$, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C (actualmente separados en IncA e IncC), T, FIIAs, F, K y B/O. Las condiciones de amplificación y los controles positivos para cada amplicón ensayado se encuentran en Carattoli *et al.* (2005). Las regiones o genes plasmídicos característicos de cada grupo de incompatibilidad y los cebadores propuestos para su detección se muestran en los anexos VIII y IX.

Para la identificación de plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncU e IncR, no incluidos en el esquema PBRT, se llevaron a cabo reacciones de PCR empleando los cebadores y condiciones propuestas por García-Fernández *et al.* (2009).

3.6.3. Conjugación

Para investigar la capacidad de transferencia horizontal de los plásmidos se llevaron a cabo experimentos de conjugación. En estos experimentos se empleó como cepa receptora *E. coli* K12 J53 resistente a rifampicina. Para ello se inocularon colonias aisladas de bacterias portadoras de plásmidos y de la cepa receptora en 2.5 ml de LB y se incubaron durante una noche en agitación a 37°C. A continuación, a 1 ml de LB estéril se añadieron 100 μ l del cultivo de la cepa donadora y 200 μ l del cultivo de la cepa receptora y se incubó en estático a 37°C durante una noche. Tras la incubación, se agitó enérgicamente la mezcla y se sembraron 100 μ l de la misma y diluciones seriadas 1:10 por extensión con ayuda de un asa de Digralsky estéril en placas de medio EMB suplementadas con antibiótico, que posteriormente se incubaron una noche a 37°C. Los antibióticos utilizados fueron rifampicina (50 μ g/ml; cepa receptora) y uno o más agentes adicionales, escogidos en función de las resistencias de codificación plasmídica: cloranfenicol (30 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml), trimetoprim (10 μ g/ml), cefotaxima (8 μ g/ml) y/o colistina (3,5 μ g/ml). De esta manera, es posible seleccionar bacterias receptoras resistentes a rifampicina que hayan adquirido el plásmido de las bacterias donadoras y que se conocen como transconjugantes. Estos transconjugantes fueron comprobados mediante antibiograma, extracción y visualización plasmídica y PCR de los genes implicados en resistencia. La

frecuencia de conjugación se calculó como el número de transconjugantes por célula donadora, resultante de la media de dos experimentos independientes. El número de células donadoras se determinó mediante recuento en placa de células viables, sembrando diluciones seriadas en medio LA.

3.7. Secuenciación de genomas y análisis bioinformático

3.7.1. Secuenciación de genomas

La secuenciación de genomas se llevó a cabo mediante las plataformas Illumina (de segunda generación) o PacBio (de tercera generación). Ambas son técnicas de secuenciación masiva o de nueva generación, basadas en la síntesis de ADN.

La tecnología Illumina, de segunda generación, utiliza la terminación cíclica reversible (CRT, “Cyclic Reversible Termination”), donde se emplean nucleótidos terminadores marcados con fluoróforos diferentes. La incorporación de un nucleótido terminador durante la síntesis de ADN emite una señal lumínica que al ser detectada permite identificar cuál es el nucleótido añadido a la secuencia. A continuación, se elimina el fluoróforo de los terminadores para evitar interferencias de señal con el siguiente ciclo, y se regenera el grupo hidroxilo del carbono 3’ mediante el uso de agentes químicos para que pueda continuar la síntesis (Ansorge *et al.*, 2009). El ADN utilizado como molde se obtiene mediante fragmentación al azar dando lugar a una colección de fragmentos que se conoce como librería. Estos fragmentos se unen por uno de sus extremos a un oligonucleótido que permite su inmovilización en una superficie sólida y actuará como cebador para la “amplificación en puente” característica de esta tecnología. Illumina permite conseguir un número elevado de lecturas de manera simultánea (hasta 20.000 millones) a un coste relativamente bajo. Sin embargo, el tamaño de las lecturas es reducido, 50-300 pb, lo cual dificulta el ensamblaje de genomas completos, que normalmente contienen secuencias repetidas de mayor tamaño que las lecturas obtenidas. Las lecturas tipo “paired-ends” se generan mediante la secuenciación de cada uno de los fragmentos de la librería por ambos extremos al mismo tiempo, lo que permite generar datos de secuencias de alta calidad y precisión.

La plataforma PacBio, de tercera generación, utiliza también la emisión de fluorescencia para secuenciar una única molécula de ADN en tiempo real (SMRT, “Single-Molecule Real-Time”). Está basada en el uso de nanopocillos con un orificio denominado “Zero-Mode Waveguide” (ZMW), en el cual se inmoviliza una única molécula de ADN polimerasa junto con la cadena de ADN molde. Durante la síntesis del ADN se incorporan nucleótidos marcados cada uno de ellos con un fluoróforo diferente, cuya incorporación provoca la emisión de luz. El paso de la luz a través del orificio ZMW es focalizada hacia un punto para su detección, lo que

permite observar la polimerización en tiempo real (sin previa amplificación del ADN) y, por tanto, conocer la secuencia (Eid *et al.*, 2009). Entre sus principales ventajas se encuentra la generación de lecturas de gran tamaño, con una media de unas 30 Kb y un tamaño máximo de 2,3 Mb (Amarasinghe *et al.*, 2020), lo que facilita enormemente el ensamblaje, además de la secuenciación monitorizada a tiempo real y la no necesidad de amplificación del ADN. A pesar de estas ventajas, presenta inconvenientes como el coste elevado y la cantidad de lecturas generadas, muy inferior a la obtenida con los métodos de segunda generación. Un problema adicional reside en su menor fidelidad (99,8%), por lo que resulta necesario corregir las lecturas mediante el uso complementario de un método de segunda generación, como Illumina cuya tasa de acierto es del 99,9%) (Sohn y Nam, 2018).

En este trabajo, la secuenciación Illumina fue realizada por la Plataforma Genómica del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR, España) o por Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania), obteniéndose lecturas pareadas (“paired-end”) de 90-150 nucleótidos a partir de librerías con fragmentos de 500 pares de bases (pb) en secuenciadores HiSeq 2500 y NovaSeq 6000 S2 PE150 XP, respectivamente. En el caso del CIBIR la preparación de las librerías se realizó sin amplificación (Truseq DNA PCR free). La secuenciación PacBio se llevó a cabo en Expression Analysis Inc. (Durham, NC, EEUU) mediante la Plataforma Pacific Biosciences (Menlo Park, CA, EEUU) RS II, a partir de librerías de fragmentos de 6,5 Kb, usando la tecnología SMRT.

Se seleccionaron para su secuenciación, 100 aislamientos con Illumina (Anexo X) y dos con PacBio. En el caso de los genomas secuenciados mediante Illumina las empresas envían al usuario los archivos que contienen las lecturas limpias (libres de adaptadores, así como de lecturas erróneas y/o de baja calidad). En el caso de PacBio la empresa envió los genomas ensamblados. Tanto para Illumina como para PacBio, el ADN de los aislamientos fue extraído utilizando el kit comercial “Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit” (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizadas las extracciones, se cuantificó la concentración del ADN y se analizó su calidad con ayuda de un espectrofotómetro Nano Drop™ 1.000 (ThermoFisher Scientific). La cantidad de ADN extraído fue proporcionada en ng/μl, en base a la absorbancia a 260 nm. La calidad del ADN se evaluó utilizando la relación existente entre la absorbancia a 260 y 280 nm y entre 260 y 230 nm. Una relación de absorbancia 260/280 nm comprendida entre 1,8-2 es indicativa de la ausencia de proteínas contaminantes, mientras que una relación 260/230 nm entre 2,0-2,2 es indicativa de la ausencia de otros contaminantes (Cercenado, 2021). El ADN de los aislamientos fue enviado, en la cantidad requerida por las empresas, dependiendo de la plataforma de secuenciación (>2 ng/μl para Illumina; 2 μg en el caso de la preparación de las librerías sin amplificación por PCR) y >80 ng/μl para PacBio.

3.7.2. Análisis de calidad, ensamblaje y anotación de los genomas secuenciados

Una vez llevada a cabo la secuenciación de genomas, se realizó su análisis bioinformático mediante el uso de diversas herramientas computacionales.

3.7.2.1. Determinación de la calidad de las lecturas

Como se comentó anteriormente, en el caso de la secuenciación Illumina, las empresas enviaron las lecturas directas y reversas limpias, es decir, filtradas y sin lecturas erróneas ni adaptadores, en formato fastq. Dicho formato es un archivo de texto que almacena la secuencia de nucleótidos y las puntuaciones de calidad correspondientes. A pesar de ello, en todos los casos se comprobó la calidad de las lecturas enviadas, utilizando el programa FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Este programa expresa la calidad mediante el valor Q (“Q Score”) o “*Phred*”, el cual viene definido por la fórmula: $Q = -10 \times \log_{10}P$, siendo P la probabilidad de error en la lectura de cada base.

Los resultados del análisis mediante FastQC consisten en una serie de gráficas, siendo la más importante la que muestra la distribución de la calidad a lo largo de las lecturas (Figura 18). Esta gráfica indica en el eje de abscisas (X) la posición en la lectura de cada base secuenciada y en el eje de ordenadas (Y) el valor de calidad Q. Los valores de Q se sitúan entre 10 y aproximadamente 40, donde 10 se corresponde con una probabilidad de error de 10^{-1} , lo que equivale a una precisión del 90%, mientras que un valor de 40 correspondería a una probabilidad de error de 10^{-4} , siendo la precisión del 99,99%. Normalmente, un valor $Q > 30$ es un indicador de buena calidad, ya que corresponde a una probabilidad $> 99,9\%$ de que el nucleótido leído sea el correcto.

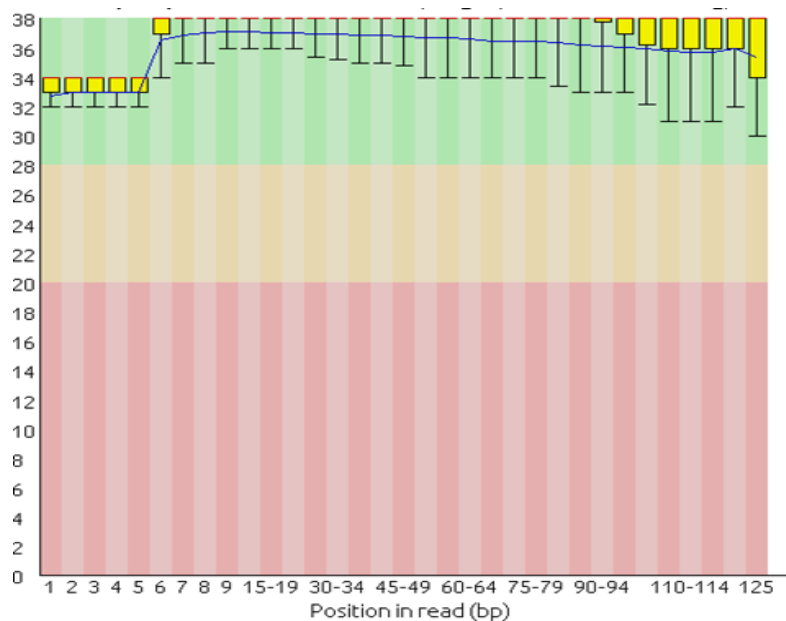


Figura 18. Análisis de la calidad de lecturas con el software FastQC. En el eje de ordenadas se representa el valor Q o “Phred” y en el eje de abscisas la posición de las bases en las lecturas. De acuerdo con el valor Q, la gráfica se distribuye en tres zonas: rosa, salmón y verde, que corresponden a calidad baja, intermedia y alta, respectivamente. En este caso, todas las bases se encuentran en la zona verde, aunque la calidad es algo inferior en los extremos.

Además de indicar la calidad de las lecturas, FastQC aporta información sobre otros parámetros como el contenido GC, la calidad de los k-meros (oligómeros de un número k de nucleótidos), si existen bases catalogadas como Ns o si algunas secuencias se encuentran sobre-representadas. Cuando la calidad de las bases disminuye o la probabilidad de encontrar cada uno de los nucleótidos no sea constante a lo largo de la secuencia es necesario realizar una limpieza o “quality trimming”. Esto se consigue mediante programas bioinformáticos como Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>), el cual permite limpiar lecturas pareadas en función de la calidad, así como eliminar restos de adaptadores y descartar las lecturas excesivamente cortas que pueden complicar e interferir en el análisis posterior.

3.7.2.2. Ensamblaje de *novo* y reconstrucción de los genomas. Determinación de la calidad del ensamblaje

El ensamblaje de *novo* de las secuencias obtenidas con Illumina se realizó “on line” mediante la herramienta “Plasmid Constellation Networks web” (PLACNETw; Lanza *et al.*; 2014; Vielva *et al.*, 2017). En primer lugar, se suben a la página web (<https://castillo.dicom.unican.es/upload>) los archivos en formato fastq comprimidos (extensión fastq.gz o fq.gz). Estas lecturas son ensambladas con el software Velvet versión 1.2.10 (Zerbino, 2010), mejorado por VelvetOptimizer para seleccionar la longitud óptima de los k-

meros. Velvet es un ensamblador de *nov*, que fusiona las lecturas de las secuencias que se solapan, en secuencias contiguas de mayor tamaño denominadas contigs, sin necesidad de utilizar un genoma de referencia (Edwards and Holt, 2013). El funcionamiento de Velvet se basa en la comparación mediante algoritmos de las secuencias obtenidas y la creación de gráficos o tablas de relaciones ponderadas para determinar que secuencias están solapadas y en qué medida lo hacen (Zerbino y Bimney, 2008). Además, PLACNETw permite la reconstrucción y visualización de plásmidos a partir de los genomas completos. Una vez ensambladas las lecturas, esta herramienta utiliza los valores aportados por Velvet para buscar las uniones entre contigs con el software Bowtie 2, dando lugar a “scaffolds” (Langmead and Salzberg, 2012). Los “scaffolds” se mapean automáticamente utilizando “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST; ver apartado 3.7.4.). La herramienta BLAST, ampliamente utilizada en el presente trabajo, encuentra regiones de similitud entre secuencias biológicas, tanto de ADN como de proteínas. En concreto, compara secuencias problema con las depositadas en la base de datos GenBank del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y calcula el grado de significación estadística. Esta base de datos es actualizada periódicamente, almacenando todas las secuencias de ADN (incluyendo genomas completos y plásmidos) y también de proteínas depositadas directamente en ella. Además, incorpora las secuencias enviadas a otras bases de datos, incluyendo las del “European Molecular Biology Laboratory” (EMBL) del “European Bioinformatics Institute” (EBI) y del “DNA Data Bank of Japan” (DDBJ) (Mizrachi, 2002).

PLACNETw utiliza BLASTn, para identificar referencias cercanas contenidas en GenBank. Realiza, además, una predicción de las secuencias codificantes (CDS, “Coding DNA Sequence”) utilizando el software Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010), que posteriormente son comparadas con la base de datos mediante BLASTp en busca de secuencias homólogas a proteínas de replicación, relaxasas y grupos de incompatibilidad plasmídicos. Finalmente se obtiene una red gráfica interactiva que separa al genoma en sus componentes, cromosoma y plásmidos, en base a los alineamientos realizados. Esta red contiene dos tipos de nodos: contigs (en azul) y genomas de referencia (en naranja) con los que mapea cada contig, así como dos tipos de enlaces: uniones entre contigs formando probables “scaffolds” (líneas continuas) y uniones de cada contig con los genomas de referencia (líneas discontinuas). PLACNETw simula las fuerzas de atracción por los bordes de los contigs que unen dos nodos y las fuerzas de repulsión entre nodos. Por tanto, la distribución de los nodos en la red dependerá de la intensidad de las fuerzas que definen sus bordes. En este punto es posible editar la red manualmente y reorganizar los componentes de la misma. Para ello, se muestran la información sobre cada contig y las referencias con las que mapea. Una vez comprobada manualmente, se guarda la red y pueden descargarse diversos archivos incluyendo, entre otros, los que contienen el genoma ensamblado, separado en sus componentes: cromosoma y, en su caso, plásmidos

(incluyendo cada uno de ellos todos los contigs conectados), los datos estadísticos del ensamblaje y el archivo con la predicción de CDS. El genoma ensamblado se obtiene en un archivo con formato fasta, que es un fichero de texto que contiene la secuencia de nucleótidos.

La calidad del ensamblaje viene determinada por valores estadísticos entre los que se incluye el número de contigs, el contig de mayor tamaño, la longitud media de los contigs, el total de pares de bases en contigs y los parámetros L50 y N50. El parámetro L50 indica el número de contigs que, ordenados de mayor a menor, contienen la mitad del tamaño del genoma; mientras que N50 indica el tamaño del menor de dichos contigs. Por ejemplo, si tenemos un L50 de 7, significa que al menos el 50% del genoma se encuentra ensamblado en 7 contigs, siendo el L50 el contig número 7. La calidad del ensamblaje fue analizada utilizando el archivo proporcionado por VelvetOptimizer y también mediante el software QUILT (Gurevich *et al.*, 2013).

En el caso de las lecturas obtenidas por PacBio, el ensamblaje fue llevado a cabo por la empresa Pacific Biosystems, utilizando para ello el “Hierarchical Genome Assembly Process” versión 3.0 (HGAP 3). Teniendo en cuenta la menor fidelidad de las lecturas obtenidas con esta plataforma, las secuencias suministradas por la compañía fueron corregidas realizando un ensamblaje híbrido con secuencias de la misma cepa obtenidas mediante la tecnología Illumina. Para ello se utilizó el ensamblador SPADES v13.2.20 (Bankevich *et al.*, 2012). El funcionamiento de SPADES es similar al de Velvet, ya que también es un ensamblador de *nov* que fusiona las lecturas de las secuencias que solapan mediante comparación de las mismas y la creación de gráficos o tablas de relaciones ponderadas para determinar cuáles solapan entre sí. El ensamblador SPADES se diferencia de Velvet en que permite el uso de secuencias obtenidas por distintas plataformas, y por tanto de distintos tamaños, así como el uso de varios algoritmos de corrección de errores en los solapamientos. Tras el ensamblaje, SPADES proporciona un archivo fasta en el que se encuentran los contigs ensamblados y corregidos. En el caso del plásmido pUO-STmRV1 (apartado 4.1.3.1.7), la corrección de errores se complementó comparando el ensamblaje con secuencias verificadas, obtenidas previamente en el grupo mediante secuenciación Sanger (P. García, 2013 Tesis doctoral), utilizando para ello el programa CloneManager.

3.7.2.3. Anotación

La anotación de los genomas secuenciados puede realizarse mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas, siendo Rast (Aziz *et al.*, 2008), Prokka (Seemann, 2014) y PGAP (“Prokaryotic Genome Annotation Pipeline”) del NCBI (Haft *et al.*, 2018) las más utilizadas. En este trabajo, todos los genomas secuenciados fueron depositados en la base de datos GenBank, donde se les asignó un número de acceso y donde fueron anotados con PGAP.

3.7.3. Análisis de los genomas

Para el análisis de los genomas secuenciados se utilizó un gran número de herramientas bioinformáticas, disponibles *on line*, en diferentes páginas web. Estas herramientas pueden utilizar como archivo de entrada lecturas (en formato fastqc), contigs y/o genomas ensamblados (en formato fasta), procedentes de distintas plataformas, entre las que se incluyen Illumina y PacBio. En este trabajo utilizamos los contigs resultantes del ensamblaje de las lecturas Illumina o el genoma completo en el caso de PacBio. Muchas de las herramientas de análisis genómico son de libre acceso. Entre ellas se encuentran las disponibles en la página web del Centro de Epidemiología Genómica (CGE) (<https://www.cge.cbs.dtu.dk/services/>), de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU), ampliamente utilizadas en esta Tesis. El procedimiento a seguir es simple, primero se selecciona la herramienta que se quiere utilizar y a continuación se sube el archivo de entrada. Una vez realizado el análisis, los resultados pueden aparecer directamente en pantalla o ser enviados al usuario por e-mail.

3.7.3.1. Determinación de la especie y serotipo *in silico*

En el desarrollo de esta tesis la especie bacteriana fue comprobada *in silico* mediante dos herramientas disponibles en la página web del CGE: KmerFinder (Hasman *et al.*, 2014) y SpeciesFinder (Larsen *et al.*, 2014), que utilizan algoritmos basados en los k-meros que resultan de fragmentar el genoma o en la secuencia que codifica el ARNr 16S, respectivamente. Cabe destacar que KmerFinder tiene mucha mayor precisión, particularmente en el caso de las enterobacterias (Larsen *et al.*, 2014).

El serotipo de los aislamientos de *Salmonella* puede también determinarse *in silico*, gracias a la herramienta SeqSero del CGE (Zhang *et al.*, 2015). Esta herramienta utiliza una base de datos que contiene los genes del clúster *rfb* implicados en la síntesis de los antígenos O y los genes *fliC* y *fliB* que codifican los antígenos flagelares de primera y segunda fase. Puede predecir de forma rápida y precisa el serotipo de un aislamiento, identificándolo entre los más de 2,300 serotipos que pueden ser detectados con esta herramienta. Determina, además, si el aislamiento es bifásico o monofásico.

3.7.3.2. Análisis MLST *in silico*

La secuencia tipo (ST) de las bacterias secuenciadas fue determinada mediante la herramienta MLST del CGE (Larsen *et al.*, 2012), que requiere seleccionar la especie en estudio. En el caso de *Salmonella*, la ST resulta de la combinación de los alelos correspondientes a siete genes conservados, pertenecientes al genoma *core* (Achtman *et al.*,

2012). Las secuencias de los alelos de los genes MLST y los datos de los perfiles alélicos empleados por dicha herramienta están disponibles en www.PubMLST.org y son actualizados automáticamente cada semana. La herramienta MLST convierte los archivos de entrada en una base de datos a través de un script escrito en perl. A continuación, se buscan en el genoma bacteriano los alelos de los genes del esquema MLST, mediante BLASTn, y en base a la combinación de alelos se da la secuencia tipo.

3.7.3.3. Detección *in silico* de genes de resistencia a antimicrobianos

A lo largo de los años se han desarrollado numerosas herramientas para la detección y caracterización de genes y mecanismos relacionados con la resistencia a antimicrobianos. En estos casos los archivos de entrada suelen ser genomas ensamblados, ya que además de identificar los genes de resistencia, proporcionan información sobre su entorno. En este trabajo la búsqueda de genes de resistencia se llevó a cabo mediante la combinación de diversas herramientas:

ResFinder (CGE). Es la primera herramienta bioinformática publicada con acceso *online*. Inicialmente solo permitía detectar genes de resistencia adquirida mediante BLASTn a partir de las lecturas crudas y/o el genoma ensamblado (Zankari *et al.*, 2012). Posteriormente fue ampliada con PointFinder, que permite detectar mutaciones cromosómicas implicadas en la resistencia de un número determinado de especies, entre las cuales se encuentra *Salmonella* (Zankari *et al.*, 2017). En la última actualización del servidor web, además de identificar genes de resistencia y mutaciones puntuales, ResFinder permite la generación de antibiogramas *in silico* (Bortolaia *et al.*, 2002). El usuario debe indicar la especie bacteriana y si quiere detectar mutaciones cromosómicas y/o genes de resistencia adquirida. En este trabajo, la búsqueda se realizó con los parámetros predefinidos en la web, 90% de identidad (ID) y 60% de cobertura mínimas, aunque ambos pueden ser modificados por el usuario. Los resultados obtenidos aportan información acerca del gen identificado, número de contig donde se encuentra y posición en dicho contig, así como información adicional relacionada con el alineamiento.

CARD (“The Comprehensive Antibiotic Research Database”). Se trata de una base de datos de genes de resistencia, sus productos y fenotipos asociados (<http://arpcard.mcmaster.ca>). La predicción de los genes de resistencia tiene lugar gracias a la incorporación de herramientas de comparación de secuencias como BLASTn y el software identificador de genes de resistencia RGI (“Resistance Gene Identifier”), a través de modelos basados en “Single Nucleotide Polymorphism” (SNP) y homologías. Las secuencias que conforman la base de datos son descargadas de GenBank (McArthur *et al.*, 2013). Es una de las mejores herramientas para la identificación de genes de resistencia a antimicrobianos, debido a que proporciona anotaciones detalladas a través de “Antimicrobial Resistance Ontology” (ARO) (Jia *et al.*, 2017).

MEGARes 2.0. Es una base de datos que incorpora tanto las secuencias de genes de resistencia a antimicrobianos, como las secuencias de genes implicados en la resistencia a metales pesados y compuestos biocidas. (<https://megares.meglab.org/>). Contiene los genes de resistencia a antimicrobianos de una base propia (MEGARes 1.0) y de otras bases de datos como ResFinder, CARD, ARG-ANNOT y el archivo de β -lactamasas de Lahey Clinic (NCBI), mientras que las secuencias que codifican resistencia frente a metales pesados y biocidas fueron incorporadas de BacMet. Al igual que ResFinder la última actualización de MEGARes incluye genes en los que la presencia de SNPs en posiciones específicas confiere resistencia (Doster *et al.*, 2019).

Para ampliar la información obtenida con estas herramientas, se construyó un base de datos con genes de resistencia a metales pesados mediante una revisión bibliográfica que permitió identificar los genes y los genomas donde fueron inicialmente descritos. Estos genes fueron extraídos de estos genomas, una vez descargados del GenBank, mediante el programa Clone Manager (CloneSuite9), realizándose finalmente una comprobación y corrección de las anotaciones, en base a la información publicada. Los resultados derivados de ResFinder fueron obtenidos vía web, mientras que en los casos de CARD, MEGARes y la base de datos propias, los resultados se obtuvieron utilizando el software ABRicate (<https://github.com/tseemann/abricate>) o a través de la herramienta MyDbFinder del CGE.

3.7.3.4. Detección y análisis de plásmidos *in silico*

La identificación y caracterización *in silico* de los plásmidos presentes en los genomas secuenciados se llevó a cabo mediante la combinación de la información obtenida con PLACNETw y las siguientes herramientas bioinformáticas:

PlasmidFinder (CGE). Permite la detección de plásmidos utilizando BLASTn en busca de homologías entre el genoma problema y los replicones contenidos en una base de datos, identificando los que comparten al menos el 80% de identidad y 60% de cobertura (Camacho *et al.*, 2009; Carattoli *et al.*, 2014). Estos parámetros vienen predefinidos por la herramienta web, aunque pueden ser modificados por el usuario. La base de datos incluye, entre otros, 559 replicones identificados en secuencias de plásmidos de 40 especies del orden *Enterobacterales* disponibles en GenBank. Los resultados obtenidos indican los replicones identificados, su localización (número de contig) y posición, así como información adicional acerca del alineamiento.

pMLST (CGE). Dada la elevada prevalencia de algunos plásmidos se han desarrollado esquemas de pMLST (“plasmid Multi-Locus Sequence Typing”) experimental, que permiten el subtipado de los pertenecientes a los grupos IncI1, IncHI1, IncHI2, IncN e IncF (Carattoli *et al.*, 2014). El subtipado de estos 5 grupos de incompatibilidad también puede realizarse *in silico* con

la herramienta del mismo nombre (pMLST). Esta herramienta contiene todas las secuencias de los alelos y perfiles ST resultantes de su combinación (<http://www.pubmlst.org/plasmid/>). Funciona de manera similar a PlasmidFinder, con unos parámetros predefinidos de $\geq 85\%$ de identidad y $\geq 66\%$ de cobertura, obteniéndose como resultado la ST del plásmido en base a la combinación de los alelos identificados.

Sub-tipificación “in silico” de plásmidos IncC. La subtipificación *in silico* de un plásmido IncC, caracterizado detalladamente en el presente trabajo, se llevó a cabo utilizando el método propuesto por Hamer and Hall (2016). En base a los SNPs presentes en el “backbone” (Bk, esqueleto) de los plásmidos IncC, estos autores los clasificaron en dos grandes grupos, denominados tipo 1 y tipo 2, que se diferencian en (1) las regiones denominadas R1 y R2, que contienen versiones alternativas de una *orf* localizada dentro de TraI (una de las dos regiones plasmídicas implicadas en conjugación): *orf1832* en los de tipo 1 y *orf1847* en los de tipo 2; (2) el gen *rhs* (recombinant hot spot): versión *rhs1* en los de tipo 1 y versión *rhs2* en los de tipo 2; (3) la presencia en los de tipo 2 pero no en los de tipo 1 de dos pequeñas inserciones: i1 (428 bp) e i2 (462 bp). Los plásmidos IncC de tipo 1 se diferenciaron, a su vez, en los subtipos 1a y 1b, en base a los SNPs acumulados en un segmento de 14.5 kb, denominado “patch tipo 1a”. Además, se encontraron plásmidos híbridos que comparten características con los de tipo 1 y de tipo 2, por ejemplo, *orf1854* y *rhs3*.

La sub-tipificación del plásmido IncC secuenciado y caracterizado en el presente trabajo se llevó a cabo mediante PCR *in silico*, utilizando cuatro parejas de oligonucleótidos diseñadas por Hamer and Hall (2016) para detección de *orf1832/orf1847*, *rhs1/rhs2/rhs3*, i1 e i2. Como controles se utilizaron las secuencias de los plásmidos pR148, pSN254, pR55 y pYR1, propuestos como modelos de los plásmidos IncC de tipo 1a, tipo 1b, tipo 2 e híbrido, respectivamente (n^{os} de acceso JX141473, CP000604, JQ010984 y CP000602, respectivamente).

MOBSCAN. Es una herramienta que permite una clasificación rigurosa de plásmidos en base a la identificación de la relaxasa (MOB). Permite clasificar una relaxasa en una de las nueve familias MOB mediante una búsqueda HMMER en base de datos (Garcillán-Barcia *et al.*, 2020).

3.7.3.5. Detección de genes de virulencia y análisis de las islas de patogenicidad *in silico*

La presencia de genes implicados en virulencia, así como la detección y análisis de SPIs se realizó utilizando las siguientes herramientas:

VFDB (Virulence Factors Data Base). Es una base de datos accesible “online” (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>), que contiene los principales genes de virulencia identificados en

32 de los patógenos clínicos más relevantes, entre los que se incluye *Salmonella* (Chen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2019). Los genes de virulencia contenidos en VFDB fueron identificados a través de artículos de investigación disponibles en PubMed, extrayéndose posteriormente sus secuencias mediante scripts de Perl a partir de genomas depositados en Genbank (Benson *et al.*, 2004). Entre los genes de virulencia incluidos se encuentran los que codifican proteínas implicadas en diversas funciones, incluidas proteínas estructurales, reguladoras y enzimas, así como genes pertenecientes a las SPIs.

SPIFinder (CGE). Es una herramienta que permite identificar islas de patogenicidad en secuencias parciales o totales con unos parámetros predeterminados del 95% ID y 60% de cobertura mínima. Esta herramienta, basada en BLAST, fue diseñada siguiendo el modelo utilizando por Zakari *et al.* (2012) para ResFinder y utilizando como referencia la herramienta “Pathogenicity Island DataBase” (PAIDB) (Roer *et al.*, 2016).

Bases de datos propias. Debido a la presencia de genes que contienen secuencias repetitivas, SPIFinder no consigue identificar algunas SPI, como SPI-4. Por ello, y para conocer con mayor profundidad la distribución y estructura de las SPIs en los aislamientos secuenciados en esta Tesis, se construyó una base de datos propia donde se incluyeron todos los genes de las 24 islas descritas hasta el momento en *Salmonella*. Para ello, se realizó una revisión bibliográfica que permitió identificar las SPIs y los genomas donde fueron inicialmente descritas. Las SPIs fueron extraídas de estos genomas, una vez descargados del GenBank, mediante el programa Clone Manager (CloneSuite9), realizándose finalmente una comprobación y corrección de las anotaciones, en base a la información publicada.

De la misma manera, también se construyó una base de datos propia incluyendo los genes que codifican los múltiples sistemas de captación de hierro descritos hasta el momento en *Salmonella*. Hay que tener en cuenta que VFDB solo incluye un número muy reducido de estos genes.

El uso de las bases de datos propias y de la VFDB se realizó mediante los programas ABRicate y MyDbFinder, al igual que en el apartado 3.7.3.3.

3.7.3.6. Búsqueda de profagos *in silico*

PHASTER. En este trabajo, la búsqueda de profagos se llevó a cabo mediante el servidor “PHAge Search Tool Enhanced Release” (PHASTER; <https://phaster.ca/>; Ardnt *et al.*, 2016), una actualización de la herramienta “PHAge Search Tool” (PHAST; Zou *et al.*, 2011) diseñada para la identificación y anotación rápida de los profagos presentes en los genomas bacterianos. Esta herramienta realiza un BLASTn de los genomas en formato fasta o gbk (este último asociado a las secuencias de GenBank) frente a una base de datos que combina las bases de datos de fagos del NCBI y la desarrollada por Srividhya *et al.* (2006). Los genes identificados

como fágicos son seleccionados y agrupados, mientras que los identificados como no fágicos en las mismas regiones, son enfrentados a una segunda búsqueda BLASTn, y se les asigna una puntuación (score) basada en la proporción de genes fágicos que contengan. Los resultados consisten en un listado de profagos donde se indica si el profago está completo (score > 90), incompleto (score < 70) o es cuestionable (score 70-90). Además, el servidor proporciona información sobre el tamaño y el porcentaje GC de la región identificada, el número de *orfs* que contiene, su posición en el genoma bacteriano y el fago con el que presenta mayor similitud. En una segunda pestaña se muestran los genes detectados por comparación con las bases de datos y una visión de la localización de las regiones fágicas en los contigs.

3.7.4. Comparación y visualización de genomas

La genómica comparativa implica la comparación de secuencias genómicas, especialmente, para la identificación de inserciones, deleciones y variación en regiones sinténicas, y también para detectar pérdidas de sintenia. La visualización de los alineamientos entre regiones específicas de múltiples genomas facilita la identificación de diferencias genotípicas que subyacen a los cambios fenotípicos entre cepas o especies. Se han desarrollado numerosas herramientas que permiten identificar secuencias disponibles en la base de datos para su uso como referencias, comparar los componentes del genoma (cromosoma y/o plásmidos), y/o comparar regiones de interés como aquellas que contienen genes de resistencia o virulencia. En este trabajo se empleó el genoma de la cepa control LT2 (nº acceso AE006468.1), así como diversas herramientas con fines comparativos:

BLAST. Como se comentó anteriormente, se trata de una herramienta de acceso online que permite detectar regiones similares entre secuencias de ADN y de proteínas, utilizando archivos de entrada en formato fasta y calculando la significación estadística de las coincidencias. Fue empleada para identificar secuencias relacionadas con las generadas en el presente trabajo, las cuales fueron usadas como control, así como para comprobar y completar las anotaciones de genes y/o regiones de interés.

Clone Manager profesional versión 9 (CloneSuite9). Es un software bioinformático desarrollado por Sci-Ed que permite llevar a cabo experimentos de clonación *in silico*. Para ello posibilita encontrar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción en moléculas o fragmentos de ADN, invertirlos, cortarlos, modificar sus extremos y unirlos (ligarlos). También permite visualizar y editar secuencias de forma rápida, detectar *orfs*, traducir genes, buscar secuencias idénticas o similares, diseñar cebadores y realizar alineamientos entre pares de secuencias de ADN o de aminoácidos, así como alineamientos múltiples. Este programa admite archivos de entrada en varios formatos, entre los que se encuentran fasta y gbk.

BRIG (“Blast Ring Image Generator”). Es una herramienta que permite la generación de imágenes interactivas a partir de la comparación de uno o más genomas o regiones, mediante una sencilla interfaz gráfica de usuario (<http://www.sourceforge.net/proyectos/brig/>). BRIG usa BLASTn para realizar las comparaciones y CGView (Stothard y Wishart, 2005) para construir las imágenes comparativas circulares. La imagen resultante se puede generar en formato JPEG, PNG, SVG o SVGZ y muestra la similitud, como un conjunto de anillos concéntricos coloreados según el porcentaje de identidad aportado por BLASTn, entre el genoma de referencia situado en el centro frente a las demás secuencias comparadas (Alikhan *et al.*, 2011).

EASYFIG. Se trata de una aplicación de Python que permite comparar múltiples genomas o regiones genómicas anotados, utilizando BLASTn disponible para su descarga en <http://easyfig.sourceforge.net/>. La secuencia del ADN de entrada se representa a escala como una línea negra sólida centrada horizontalmente, sobre la cual Easyfig puede colocar *orfs* de diferentes longitudes. La dirección de transcripción de cada *orf* viene determinada por flechas (Sullivan *et al.*, 2011). Las homologías detectadas entre los genomas se representan mediante líneas verticales que unen bloques homólogos coloreadas según el porcentaje de identidad aportado por BLASTn y además, indica la presencia de regiones invertidas. Las figuras generadas con Easyfig se guardan en formato de gráficos vectoriales (svg) con una resolución definida para su posterior manipulación mediante el programa de edición de imágenes InkScape (<https://inkscape.org/es/>).

3.7.5. Reconstrucción de regiones de plásmidos, islas genómicas y otras regiones de resistencia

En algunos casos fue necesaria la reconstrucción de plásmidos u otras regiones de interés que, debido a la presencia de ADN repetido, no pudieron ser ensambladas en un único contig. Para ello, los contigs pertenecientes al plásmido o la región de interés fueron identificados con la ayuda de BLASTn, PLACNETw y/o la herramienta “Scan for similarity” de CLONE Manager, utilizando en este último caso una secuencia de referencia. Esto permite establecer una hipótesis sobre el orden de los contigs que después es confirmada (o descartada) mediante amplificaciones por PCR con oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias de los extremos de los contigs (Anexo VII), seguida de secuenciación Sanger de los productos de amplificación obtenidos (realizada por STAB VIDA, Caparica, Portugal).

3.7.6. Análisis filogenético

En este trabajo, el análisis filogenético de las distintas secuencias analizadas se llevó a cabo por dos procedimientos diferentes:

RAXML (“Randomized Axelerated Maximum Likelihood”). Las CDS extraídas mediante Prodigal con PLACNET se agruparon utilizando CD-HIT-EST (Li and Godzik, 2006). Los genes comunes fueron seleccionados mediante un script de elaboración propia (disponible en el CIBIR) y posteriormente se concatenaron y alinearon con Muscle (Edgar, 2004). Se realizó una selección mediante trimAl (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009), y se utilizó el software Harvesttools (Treangen *et al.*, 2014) para extraer sitios polimórficos y construir una matriz de SNPs. Finalmente, se utilizó el programa RAXML (Stamatakis, 2006), basado en el método de máxima verosimilitud, para construir los árboles filogenéticos, realizando 100 o 1.000 réplicas de cada árbol para la determinación del Bootstrap. Este parámetro indica el porcentaje de veces que una ramificación aparece en las réplicas, lo cual guarda relación con la robustez del árbol. Para visualizar el árbol obtenido se utilizó la herramienta Archaeopteryx (Han and Zmasek, 2009).

CSIPhylogeny (CGE). Esta herramienta infiere una filogenia basada en la alineación concatenada de SNPs de alta calidad. Para ello, mapea las secuencias frente a una de referencia mediante la herramienta BWA (“Burrows- Wheeler Alignment”; Li and Durbin, 2009). A continuación, calcula la profundidad de cada posición mapeada e identifica los SNPs mediante SAMTools v.0.1.18 (Li *et al.*, 2009). Estos SNPs son filtrados en base a unos criterios de calidad establecidos por las herramientas BWA y SAMTools. Finalmente, se comparan todas las secuencias solapantes y todos los SNPs filtrados para su validación (Kaas *et al.*, 2014). Esta herramienta permite obtener un archivo de texto que contiene la matriz de SNPs y proporciona un archivo fasta con los alineamientos obtenidos a partir de las secuencias analizadas. Este archivo fasta se utilizó para construir un árbol filogenético mediante el servidor online MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>; Katoh *et al.*, 2019), un programa de alineamiento múltiple para secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Tras la selección de los alineamientos, MAFFT utiliza las herramientas automatizadas para la selección de secuencias CD-Hit (Li *et al.*, 2001) y MaxAlign (Gouveia- Oliveira *et al.*, 2007). A continuación, se realiza el análisis filogenético utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”; Saitou and Nei, 1987) o el método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages”; Sokar and Michener, 1958). La visualización de los árboles puede realizarse mediante dos programas: Phylo.io (Robinson *et al.*, 2016) o Archaeopteryx (Han and Zmasek, 2009).

Finalmente, los árboles obtenidos con ambos procedimientos (RAXML o CSIPhylogeny) se descargaron en formato svg y, en los casos en los que fue necesaria la modificación de nombres, colores, etc., esto se hizo manualmente utilizando el editor de imágenes InkScape.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. A thin pink line starts from the top left and curves around the circles. Another thin pink line starts from the top right and curves around the bottom right circle. The circles are arranged in a descending sequence from top to bottom.

RESULTADOS

“La ciencia se compone de errores que, a su vez, son los pasos hacia la verdad”

(Julio Verne)

4.1. Variante monofásica de Typhimurium

La primera parte de la Tesis Doctoral consistió en la caracterización de aislamientos de la variante monofásica del serotipo Typhimurium recuperados en el Principado de Asturias y otras comunidades del norte de España. El estudio se centró principalmente en aislamientos de origen clínico, aunque también incluyó aislamientos procedentes de alimentos.

4.1.1. Seguimiento epidemiológico de la variante monofásica en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018

4.1.1.1. Aislamientos de origen clínico

Durante los años 2008-2018 se registraron en el PA 615 aislamientos monofásicos procedentes de muestras clínicas. En este periodo el número de aislamientos varió de manera considerable, detectándose uno o incluso ninguno en los primeros años, e incrementándose posteriormente hasta alcanzar una tendencia ligeramente descendente en los últimos (Figura 19). El porcentaje en relación al número total de salmonelas se situó entre un mínimo de 0% en 2009 (0/186) y un máximo de 70,1% en 2013 (75/107).

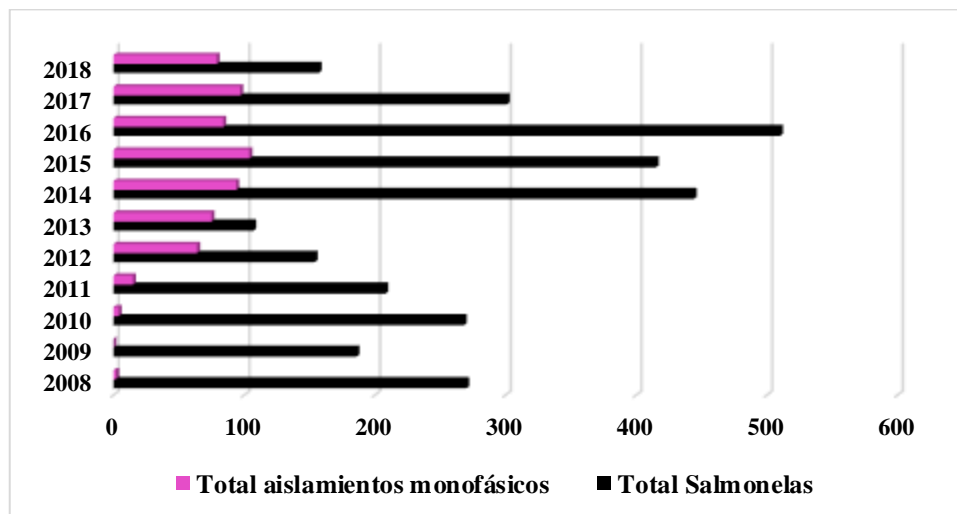


Figura 19. Evolución de los aislamientos de origen clínico pertenecientes a *Salmonella enterica* y a la variante monofásica de Typhimurium registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018. En la gráfica se representa el número de aislamientos registrados por años (datos cedidos por el Laboratorio de Salud Pública).

En consonancia con el número de habitantes, el 33% de los aislamientos proceden del área sanitaria IV, seguida del área V (24,4%) y del área III (22%), mientras que en el resto de las áreas (I, II, VI, VII y VIII) la incidencia registrada fue mucho menor. No parecen existir grandes diferencias en función del sexo de los pacientes, afectando un 44,4% de los casos registrados a hombres y un 55,2% a mujeres, mientras que en el porcentaje restante, 0,4%, se desconoce el

sexo del paciente. Además, aunque en cuatro casos no consta la edad del paciente, en los restantes se observa una mayor incidencia en niños con edades comprendidas entre los 3 y los 14 años, grupo mayoritario que incluye el 39,2% de los casos registrados. Un 24,1% tuvo lugar en adultos mayores de 60 años. En niños menores de dos años y personas de 14 a 60 años, la incidencia fue del 14,1% y 22%, respectivamente.

4.1.1.2. Aislamientos de alimentos

Durante el periodo de estudio, se detectaron en el PA un total de 126 aislamientos procedentes de alimentos, en concreto, superficie de canal porcino, bovino o sin especificar, productos cármicos y derivados, incluyendo carne picada y picadillo especificando o no el animal de procedencia, salchicha fresca, hamburguesa de temera y huevos frescos. Durante el periodo 2011 a 2015 se observa un aumento en el número de los pertenecientes a la variante monofásica, llegando a representar en 2015 más de la mitad de los aislamientos detectados. A partir de este año, tanto el número total de salmonellas como el de aislamientos monofásicos disminuyó considerablemente, llegando incluso a no detectarse ninguno en el último año, al igual que ocurrió durante los primeros tres años (Figura 20).

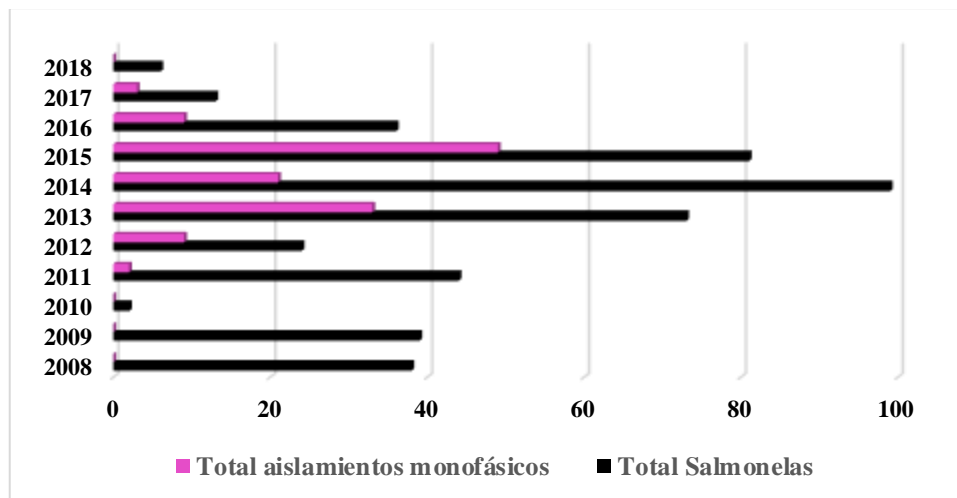


Figura 20. Evolución de los aislamientos de la variante monofásica recuperados de alimentos en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018. En la gráfica se representa el número de aislamientos registrados por años (datos cedidos por el Laboratorio de Salud Pública).

Finalmente, cabe destacar que durante el periodo 2008-2018 se detectaron 15 brotes de transmisión alimentaria causados por *S. enterica* en el PA. De ellos, solamente dos fueron debidos a la variante monofásica. El primero ocurrió en 2013, afectó a cuatro miembros de una unidad familiar y se asoció al consumo de carne de cerdo. El segundo fue un brote comunitario de etiología desconocida, que afectó a 5 personas en el año 2014.

4.1.2. Secuenciación de genomas

Durante esta Tesis Doctoral, se secuenciaron con la plataforma Illumina un total de 51 aislamientos monofásicos de origen clínico y de alimentos, obtenidos en el PA durante el periodo 2008-2018. De ellos, 16, 7 y 28 pertenecieron a los clones español, sud-europeo y europeo, respectivamente. Se secuenciaron, además, otros 23 aislamientos del clon español y un aislamiento del clon europeo recuperados entre 1997 y 2007, previamente caracterizados por nuestro grupo de investigación (Guerra *et al.*, 2000; 2001; García *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013), junto con 8 aislamientos procedentes de un hospital de País Vasco. Otros dos aislamientos, LSP 389/97 y LSP 207/07, seleccionados como representantes de los clones español y europeo, también se secuenciaron con PacBio.

En todos los casos, la calidad de las lecturas enviadas por la empresa encargada de la secuenciación fue elevada, obteniéndose un valor $Q > 20$ (ver apartado 3.7.2.1 y Figura 18 para un ejemplo representativo). Los genomas fueron ensamblados con Velvet a través de la web PLACNETw, variando el número de contigs entre 79 y 218. El tamaño de los genomas secuenciados osciló entre 4.920.808 pb y 5.394.276 pb y su contenido GC fue del 53%, aproximadamente. Estos y otros parámetros referentes a todos los genomas ensamblados se detallan en el anexo X. Por otro lado, PLACNETw permitió la reconstrucción de los genomas en sus componentes (cromosoma y plásmidos), encontrándose entre cero y seis plásmidos por aislamiento. Ejemplos representativos de los parámetros relativos al ensamblaje y la reconstrucción de un genoma con PLACNETw se muestran en la Tabla 9 y en la Figura 21, respectivamente. Además, todos los genomas secuenciados fueron depositados en la base de datos GenBank, bajo los números de acceso recogidos en el anexo X. Todos ellos fueron anotados con mediante el pipeline PGAP del NCBI.

Tabla 9. Parámetros relativos a los ensamblajes de dos genomas de la variante monofásica, secuenciados con Illumina y obtenidos con PLACNETw.

Aislamiento ^a	Kmer ^b	Contigs	N50 ^c	Contig más largo (pb)	pb totales en contigs ^d	contigs > 1 Kb	Tamaño de la librería (pb)
LSP 255/08	93	93	320.178	929.652	4.949.921	48	531 +/- 142
LSP 197/14	131	198	324.887	930.230	4.963.683	51	318 +/- 101

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, kmer, subsecuencias de longitud k contenidas dentro de las lecturas obtenidas de la secuenciación.

c, N50, representa la longitud del contig en el que, ordenando contigs de mayor a menos en función de su tamaño, se representa al menos el 50% de tamaño del genoma completo (Zerbino, 2010).

d, Tamaño estimado del genoma.

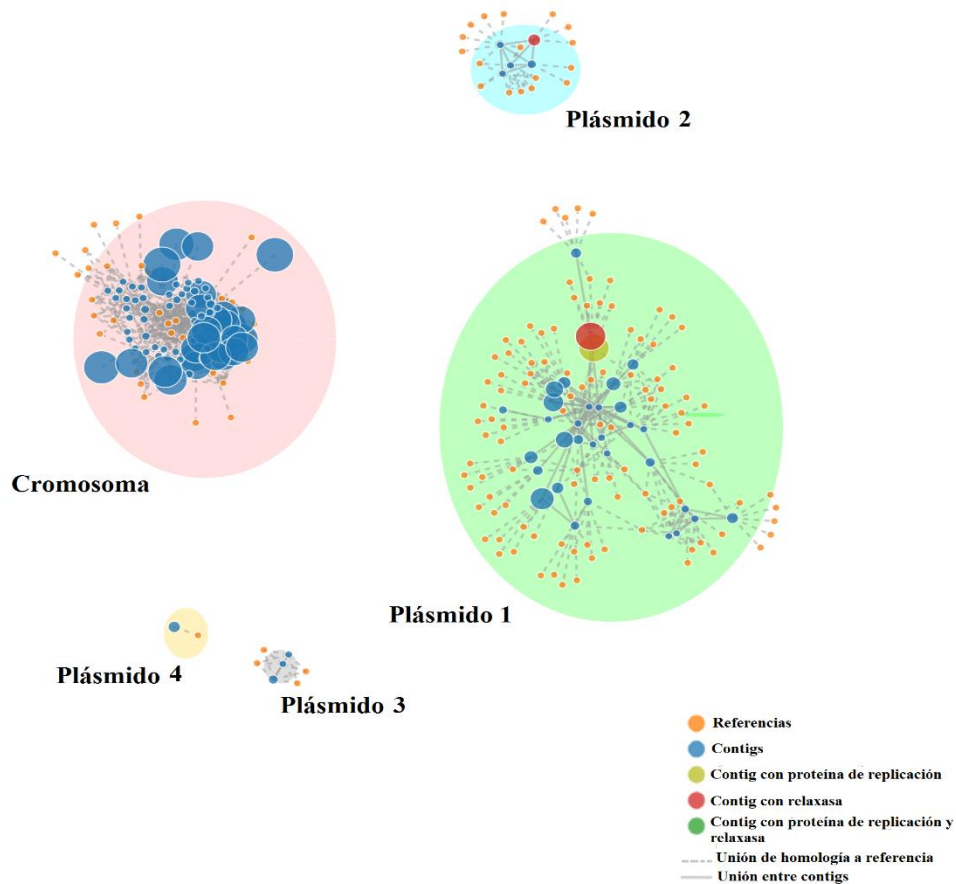


Figura 21. Reconstrucción de un genoma bacteriano analizado a través de PLACNETw. En naranja se indican genomas de referencia; en azul los nodos correspondientes a los contigs; en rojo los contigs que contienen relaxasas; en verde claro los nodos que contiene proteínas de replicación plasmídica; y en verde se indicarían los contigs que contienen proteínas de replicación y relaxasa (no se observa en este ejemplo). Las líneas continuas indican la unión entre contigs, mientras que las líneas discontinuas indican la unión del contigs con la referencia en que mapea.

En cuanto a la secuenciación SMRT-PacBio, el genoma de LSP 389/97 se distribuyó en dos contigs que, una vez circularizados, dieron lugar al cromosoma de 4.901.979 pb y al plásmido pUO-STmRV1, característico de la cepa, cuyo tamaño fue de 197.365 pb. De acuerdo con ello, el genoma completo de LSP 389/97 consta de 5.099.344 pb con un contenido GC del 52%. Por su parte, el genoma de LSP 207/07 se distribuyó en tres contigs, de 4.779.616, 158.435 y 17.230 pb, todos ellos pertenecientes al cromosoma bacteriano. De acuerdo con esto, el genoma completo de LSP 207/07 fue de 4.955.281 pb con un contenido GC del 52,2%. Ambos genomas fueron anotados con PGAP del NCBI y depositados en la base de datos genbank bajo los n°s de acceso CP018219-CP018220, correspondientes al cromosoma y plásmido de LSP 389/97, y VCMG00000000 para LSP 207/07.

4.1.3. Características generales de los aislamientos clínicos obtenidos en el Principado de Asturias durante 2008-2018

Mediante serotipificación, llevada a cabo en el CNM, los aislamientos se asignaron a dos fórmulas antigénicas: 4,5,12:i:- (72%) y 4,12:i:- (28%). Todos poseen el antígeno mayor O:4 que caracteriza al serogrupo B y pueden contener o no el antígeno O:5 resultante de la acetilación del anterior. Sin embargo, carecen del antígeno O:1 que expresan algunas salmonelas del serogrupo B al ser lisogenizadas por un profago. Estas fórmulas revelan, además, la ausencia del antígeno flagelar de segunda fase, responsable del fenotipo monofásico. Por otro lado, la fagotipificación, realizada en el CNM hasta el año 2016, puso de manifiesto una amplia variabilidad. La mayoría de los aislamientos fagotipados (436) se asignaron a los fagotipos DT138 (25%), RDNC (16,7%), U311 (12,8%), DT193 (9,6%), DT195 (8,3%), DT120 (5,7%), DT104B (3%), DT104 (2,7%), DT22 (2,3%), DT7a (2%) y U302 (0,7%). El 7,3% de los aislamientos no fueron tipificables con la librería de fagos utilizada (UT), mientras que un 3,1% pertenecieron a los fagotipos DT18, DT2, DT7, DT7a, DT8, U323, y DT104L. En los 179 aislamientos de 2017 y 2018 no se determinó el fagotipo.

Finalmente, en cuanto a la resistencia a antibióticos solo nueve aislamientos (1,5%), fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados, mientras que los 606 restantes fueron resistentes a uno o más antibióticos. En base a los fenotipos de resistencia, junto con los genes implicados y su localización (que se indicarán más adelante), los aislamientos fueron tentativamente asignados a los clones español, sud-europeo y europeo.

4.1.3.1. El clon español

Un total de 15 aislamientos (2,4%) recuperados a partir de muestras clínicas en el PA fueron asignados al clon español. En concreto se obtuvieron de heces (14) y orina (1; habiéndose encontrado también en heces del mismo paciente, este último secuenciado). El mayor número de aislamientos corresponden a las áreas sanitarias III (26,6%) y V (33,4%), mientras que los restantes proceden del área IV (20%: HUCA y HMN, con 3 y 1 aislamiento, respectivamente) y del área sanitaria I (20%) (Tabla 10).

Tabla 10. Características generales de los aislamientos monofásicos del clon español analizados en este trabajo.

Aislamiento ^a	Serotipo	Fagotipo ^b	Procedencia ^c	Paciente ^d		Muestra
				Sexo	Edad	
LSP 207/08	4,5,12:i:-	U302	HMN	M	70	Heces
LSP 196/10	4,5,12:i:-	U302	HJ	M	32	Heces
LSP 48/12	4,5,12:i:-	U302	HUCA	M	11	Heces

(Continuación Tabla 10)

LSP 62/12	4,5,12:i:-	UT	HUC	M	57	Heces
LSP 127/12	4,5,12:i:-	U302	HUC	H	73	Heces
LSP 61/13	4,5,12:i:-	U302	HUC	H	4	Heces
LSP 245/13	4,5,12:i:-	DT193	HJ	M	25	Heces
LSP 259/13	4,5,12:i:-	U302	HJ	M	54	Heces
LSP 474/14	4,5,12:i:-	U302	HUSA	H	56	Heces
LSP 2/15	4,5,12:i:-	UT	HUSA	H	75	Heces
LSP 438/15	4,5,12:i:-	U302	HUCA	H	52	Heces
LSP 304/17	4,5,12:i:-	ND	HUSA	M	6	Heces
LSP 53/18	4,5,12:i:-	ND	HUC	M	70	Orina
LSP 54/18	4,5,12:i:-	ND	HUC	M	70	Heces
LSP 148/18	4,5,12:i:-	ND	HUSA	M	nd	Heces

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública. Los aislamientos LSP 53/18 y LSP 54/18 fueron aislados del mismo paciente.

b, DT, Definite Type; UT, UnTypeable; ND, no determinado.

c, HMN, Hospital Monte Naranco; HJ, Hospital de Jario; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; HUC, Hospital Universitario de Cabueñes; HUSA, Hospital Universitario San Agustín.

d, Sexo: M, mujer; H, hombre; nd, no disponible.

4.1.3.1.1. Determinación de serotipo, fagotipo y secuencia tipo

Como se comentó con anterioridad tanto el serotipo como el fagotipo fueron determinados en el CNM. En cuanto al serotipo, todos los aislamientos clínicos del clon español recuperados en el Principado de Asturias pertenecientes al periodo 2008-2018 fueron asignados experimentalmente al serotipo 4,5,12:i:-. La mayor parte de los aislamientos pertenecieron a los fagotipos U302 (8), y DT193 (1). Dos aislamientos no pudieron ser tipados con la librería utilizada y en 4 de 2017-2018 no se conoce el fagotipo.

El MLST fue determinado *in silico*, observándose que todos los aislamientos compartieron alelos idénticos para los 7 genes conservados del esquema utilizado: *aroC10*, *dnaN7*, *hemD12*, *hisD9*, *purE5*, *sucA9* y *thrA2*. Esta combinación alélica corresponde a la secuencia tipo ST19, característica del clon monofásico español.

4.1.3.1.2. Caracterización de la resistencia a antibióticos, metales pesados y compuestos derivados de amonio cuaternario

Mediante la técnica del antibiograma se demostró la resistencia de los aislamientos a dos, tres y cuatro o más de los antibióticos ensayados, siendo estos últimos considerados MDR. En concreto, se detectaron resistencias frente a sulfonamidas (100%), ampicilina (92,9%), tetraciclina (92,9%), gentamicina/tobramicina (85,7%), estreptomina (2,9%), trimetoprim (1,4%) y cloranfenicol (1,4%), todas ellas características del clon español. Los genes

responsables, identificados mediante amplificación por PCR, fueron *bla*_{TEM-1B} (ampicilina), *cmlA1* (cloranfenicol), *aadA1*, *aadA2*, *strA* y *strB* (estreptomina), *aac(3)-IV* (gentamicina/tobramicina), *sul1*, *sul2* y *sul3* (sulfonamidas), *tet(A)* (tetraciclina) y *dfrA12* (trimetoprim). La secuenciación de los genomas permitió la comprobación *in silico* de los resultados obtenidos experimentalmente. Además, se detectó el gen cromosómico *aac(6')-Iaa*, de resistencia a amikacina y tobramicina, que no se expresa en *Salmonella*.

La combinación de las resistencias observadas y los genes responsables, permitió definir 7 perfiles denominados con la letra R seguida de un número (Rn) en base a los perfiles previamente descritos por García *et al.* (2013). El perfil R1 heptarresistente, característico del clon español y mostrado por la cepa control LSP 389/97, solo fue compartido por un aislamiento del periodo 2008-2018 (Tabla 11). En este periodo, el perfil mayoritario fue R14 (57,1%), mientras que el resto de los perfiles corresponden a variantes de este, asociadas a la pérdida de una, dos, tres o cinco resistencias.

Tabla 11. Origen, fagotipo y perfiles de resistencia de los aislamientos clínicos del clon español detectados en el Principado de Asturias durante el período 2008-2018.

Aislamiento ^a	Perfil R	Fenotipo/ Genotipo R ^b
LSP 389/97	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmlA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>
LSP 207/08	R2	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmlA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>dfrA12</i>
LSP 196/10	R11	[AMP, AMX], [GEN, TOB], STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-Iva</i> , <i>strB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 48/12	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 62/12	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 127/12	R10	SUL, TET/ [<i>sul1-sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 61/13	R13	[AMP, AMX], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 245/13	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 259/13	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 474/14	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 2/15	R12	[AMP, AMX], [GEN, TOB], STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 438/15	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 304/17	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 54/18	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
LSP 148/18	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmlA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>

RESULTADOS

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública. Todos los aislamientos secuenciados proceden de heces.
b, AMP/AMX, ampicilina/amoxicilina; CHL, cloranfenicol; STR, estreptomycin; SUL, sulfonamidas; GEN/TOB, gentamicina/tobramicina; TET, tetraciclinas; TMP, trimetoprim.

Además de los genes de resistencia a antibióticos el análisis bioinformático permitió investigar la presencia o ausencia de genes implicados en la resistencia a metales pesados, tales como mercurio, plata, cobre y arsénico, así como compuestos antisépticos derivados de amonio cuaternario. Para la identificación de estos genes se utilizó la base de datos MEGares 2.0 en combinación con una propia. Los resultados obtenidos (Tabla 12) se resumen a continuación:

- El locus *mer* (*merRTPCADE*) implicado en la resistencia a mercurio fue identificado intacto en 8 aislamientos, mientras que los 6 restantes presentaron una copia truncada (*merRTPC-ΔmerA*).
- Los genes *sil* (*silEFSRCBAGP*), de resistencia a plata y cobre se detectaron intactos en 12 de los aislamientos, mientras que en uno de ellos (LSP 148/18) solo se mantuvieron *silFSRPA* y en otro (LSP 127/12) no se encontró ninguno.
- Los genes *arsH* y *arsR2*, de resistencia a organoarsenicales, fueron detectados en todos los aislamientos analizados excepto dos (LSP 304/17 y LSP 54/18). No se identificaron, sin embargo, genes de resistencia a derivados inorgánicos de arsénico.
- Se detectaron variantes intactas (*qacH*) y truncadas (*qacEΔ1*) de genes *qac*, que se localizan en integrones de clase 1 de tipo *sul1* y de tipo *sul3*, respectivamente, y confieren resistencia a compuestos derivados de amonio cuaternario. Dos aislamientos presentaron ambos genes; 11 solamente *qacEΔ1* y un único aislamiento fue negativo para ambos.

Tabla 12. Contenido de genes de resistencia a metales pesados en aislamientos clínicos del clon monofásico español detectados en el Principado de Asturias durante el período 2008-2018.

	MER							SIL								ARS		QAC		
	<i>merR</i>	<i>merT</i>	<i>merP</i>	<i>merC</i>	<i>merA</i>	<i>merD</i>	<i>merE</i>	<i>silE</i>	<i>silF</i>	<i>silS</i>	<i>silR</i>	<i>silC</i>	<i>silB</i>	<i>silA</i>	<i>silG</i>	<i>silP</i>	<i>arsH</i>	<i>arsR2</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacH</i>
LSP 389/97																				
LSP 207/08																				
LSP 196/10																				
LSP 48/12														*						
LSP 62/12														*						
LSP 127/12				*																
LSP 61/13																				
LSP 245/13														*						
LSP 259/13														*						
LSP 474/14				*																
LSP 2/15				*										*						
LSP 438/15				*											*					
LSP 304/15				*										*						
LSP 54/18				*										*						
LSP 148/18																				

MER, mercurio; SIL, plata; ARS, arsénico; QAC, Compuestos del amonio cuaternario; se señala con (*) los genes que se han encontrado truncados respecto a los de referencia disponibles en las bases de datos.

4.1.3.1.3. Análisis plasmídico

La detección experimental de plásmidos en base al esquema PBRT identificó el replicón IncC en todos los aislamientos y el replicón IncII-I(α), denominado también IncII-I γ , en uno de ellos. Estos resultados fueron corroborados *in silico* con PlasmidFinder que, además, aportó información adicional sobre replicones Col. Por otro lado, la reconstrucción de los genomas utilizando PLACNETw permitió establecer, de manera más precisa, el número de plásmidos presentes en cada aislamiento, así como conocer su tamaño y aportar información adicional acerca de los mismos (Tabla 13). Así, el tamaño de los plásmidos IncC varió entre 120 y 180 Kb, aproximadamente, y fue de 120 Kb en el caso del plásmido IncII-I(α). Estos plásmidos contienen elementos implicados en la transferencia conjugativa como es el caso de las relaxasas TraI/MOBH y SeAH/MOBP, así como proteínas de replicación pertenecientes a los grupos Rpt-A5 y Rpt-Z, respectivamente. Finalmente, para una mejor caracterización de los replicones, los plásmidos IncC e IncII-I(α) se tipificaron mediante la herramienta pMLST (DTU). Los primeros presentaron alelos *repA* y *parA* (*repA5* y *parA4*) diferentes a los registrados para otros plásmidos IncC, que corresponderían a una nueva secuencia tipo, relacionada con ST10. Por su parte, el plásmido IncII-I(α) fue asignado a la secuencia tipo ST259 y al complejo clonal CC-2.

Cabe destacar, además, que el análisis *in silico* permitió demostrar la existencia de un plásmido de 54,8 Kb en uno de los aislamientos, cuyo grupo de incompatibilidad no se pudo determinar, y también identificar el tamaño (entre 10,8 y 2 Kb) y, en algunos casos, el replicón de otros plásmidos presentes en los aislamientos: ColE, Col(BS512), que apareció en todos los aislamientos, Col8282 y Col(PHAD28). En base a la información obtenida se identificaron 13 perfiles plasmídicos, designados con la letra P seguida de un número (Tabla 13). En total se identificaron 14 perfiles plasmídicos, sin tener en cuenta el tamaño de los plásmidos IncC. En cuanto a estos, en base al tamaño y contenido en genes de resistencia, se identificaron 14 variantes, todas ellas diferentes del plásmido pUO-STmRV1 original, perteneciente a la cepa de referencia LSP 389/97.

Tabla 13. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon español recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

Aislamiento ^a	Perfil P ^b	Tamaño de plásmido (Kb)	Contigs ^c	Inc ^d	Relaxasa ^e	Proteína de replicación ^f
LSP 389/97	P1	179.153	31	IncC + IncN	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.073	1*	nd	ni	ni
		2.101	1*	nd	ni	ni
LSP 207/08	P5	164.679	31	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		14.518	1	nd	ni	ni
		12.901	11	Col(BS512) + Col8282	ni	ni
		5.052	8	oriColE	ni	ni

RESULTADOS

(Continuación Tabla 13)

LSP 196/10	P2	155.741	26	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.073	1*	Col(BS512)	ni	ni
		2.101	1*	ND	ni	ni
		1.888	1*	oriColE	ni	ni
LSP 48/12	P11	157.533	27	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.594	3	NDCol(BS512)	ni	ni
		3.142	6	oriColE	ni	ni
		2.677	5		ni	ni
LSP 62/12	P12	152.856	26	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		8.718	6	Col(BS512)	ni	ni
		1.044	4	oriColE	ni	ni
LSP 127/12	P13	128.459	19	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.418	1*	Col(PHAD28)	mbeA/MOBP	Rpt-L2
		4.230	1*	oriColE	ni	ni
		4.203	1	oriColE	ni	ni
		3.830	1*	NDCol(BS512)	ni	ni
		3.143	6		ni	ni
LSP 61/13	P14	150.970	28	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		3.143	6	Col(BS512)	ni	ni
		2.570	5	oriColE	ni	ni
LSP 245/13	P5	143.284	27		tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		14.518	1	IncC	ni	ni
		5.424	8	NDCol(BS512)	ni	ni
		3.652	9	NDND	ni	ni
		2.677	5		ni	ni
LSP 259/13	P15	157.802	28	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		5.115	6	NDCol(BS512)	ni	ni
		3.651	9	oriColE	ni	ni
		2.677	5		ni	ni
LSP 474/14	P16	155.767	33	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		7.281	5	nd	MOBP1-T4SS	ni
		4.073	1*	Col(BS512)	ni	ni
		2.622	3	ND	ni	ni
LSP 2/15	P20	133.879	32	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		120.017	24	Incl1-1(α)	seHA/MOBP1-T4SS	Rpt-Z
		4.203	1	Col(BS512)	ni	ni
		3.924	11	Col(BS512)	ni	ni
		2.667	5	oriColE	ni	ni
LSP 438/15	P18	141.765	31	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.203	1	NDoriColE	ni	ni
		2.677	5	Col(BS512)	ni	ni
		2.622	3		ni	ni
LSP 304/17	P17	140.638	28	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.091	1*	Col8282	MOBQ-T4SS	Rpt-F
		4.073	1*	NDCol(BS512)	ni	ni
		3.142	6	oriColE	ni	ni
		2.677	5		ni	ni
LSP 54/18	P10	137.672	26		tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		54.805	1*	IncC	MOBP1-T4SS	ni
		4.221	1	NDCol(BS512)	MOBQ-T4SS	Rpt-F
		4.091	1*	NDCol8282	ni	ni
		3.142	6	oriColE	ni	ni
		2.677	5		ni	ni
LSP 148/18	P21	158.125	34	IncC	tral/MOBH-T4SS	Rpt-A5
		8.840	2	NDCol(BS512)	mobA/MOBP1-T4SS	ni
		2.621	3		ni	ni

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

- b, P, perfil plasmídico.
 c, Los plásmidos cerrados se indican con asterisco (*).
 d, ND, no determinado.
 e,f,g, ni, no identificado.

En cuanto a las propiedades aportadas por los plásmidos a las bacterias que los contienen, cabe destacar que todos ellos son crípticos a excepción del IncII-I(α), que contiene genes de resistencia *strA*, *strB* y *sul2* (a estreptomicina y sulfonamidas), y de los IncC que aportan todos los demás genes de resistencia encontrados en los aislamientos, junto con genes de virulencia procedentes de pSLT. En concreto, el locus *spv* completo (*spvABCDR*) se detectó en todos los plásmidos IncC excepto en el de LSP 438/15.

4.1.3.1.4. Identificación de genes de virulencia

El análisis bioinformático permitió rastrear la presencia y/o ausencia de diversos genes y elementos génicos implicados en virulencia, tales como genes de biosíntesis de flagelos y fimbrias, islas de patogenicidad, otros genes de virulencia de localización cromosómica, genes del plásmido de virulencia pSLT y profagos.

4.1.3.1.4.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásico

En cuanto a los genes flagelares, todos los aislamientos compartieron los operones *fliABCDEFGHIJKLMN**OPQRSTYZ*, *flgABCDEFGHIJKLMN*, *cheABMRWYZ* y *flhABCDE* completos, así como el gen *flk* y los genes *motAB*. Sin embargo, en todos ellos se constató la ausencia de los genes *fljAB* y *hin* responsables de la expresión de los antígenos flagelares de segunda fase.

Para determinar de forma precisa las bases genéticas del fenotipo monofásico, se analizó el entorno de los genes *fljAB-hin* usando como referencia la región correspondiente del genoma de *Typhimurium* LT2. Los resultados se muestran en la Figura 22. En todos los aislamientos se observó una deleción que fue causada por la inserción de IS26 en dicha región. La deleción se inició siempre en el mismo punto, dentro de STM2758 (de acuerdo con la anotación del genoma de LT2), y se extendió hasta el interior de *iroB* (STM2773), afectando por tanto a los genes *fljA*, *fljB* y *hin*. Así, en todos los casos se mantienen 118 pb de las 1.542 pb de que consta STM2758, mientras que en función del ADN remanente del gen *iroB* se identificaron dos patrones de deleción diferentes. Estas deleciones, que eliminan el 44,8% y el 31,6% de la longitud de *iroB* (500 y 353 pb de 1.116 pb) se designaron $\Delta fljAB-1$ y $\Delta fljAB-5$

RESULTADOS

siguiendo la nomenclatura previamente publicada (Laorden *et al.*, 2010; García *et al.*, 2013). Cabe destacar que $\Delta fljAB-5$ es de nueva descripción.

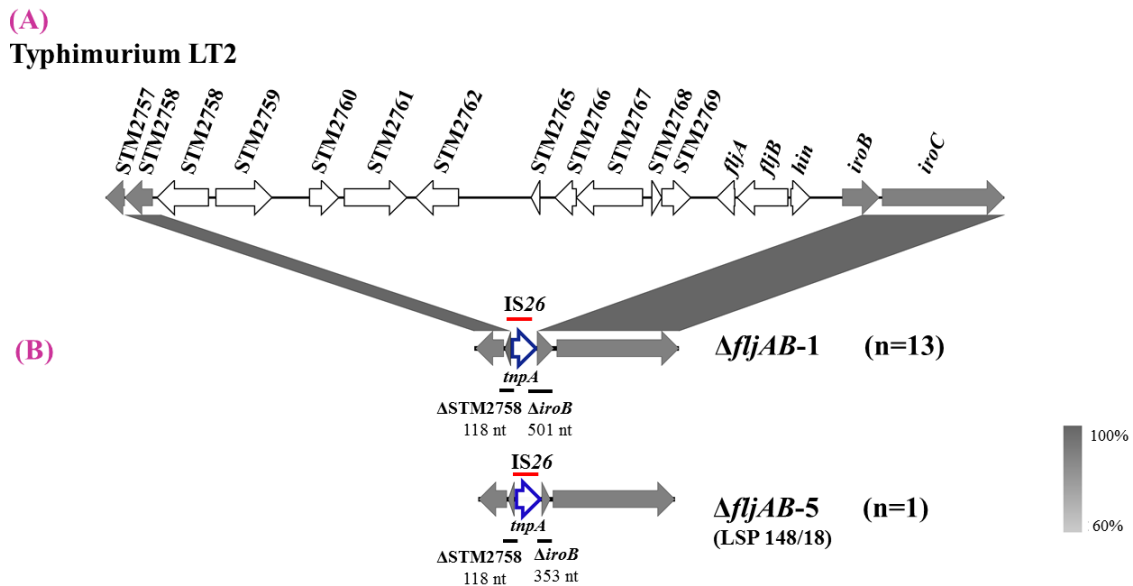


Figura 22. Caracterización de la región *fljAB-hin* en los aislamientos del clon español. Figura realizada con Easyfig BLASTn a partir de los n°s de acceso AE006468.1, CP018219 y JAHTIH000000000, correspondientes a LT2, LSP 389/97 y LSP 148/18, respectivamente. Las *orfs* se representan con flechas dispuestas en la orientación de transcripción. En blanco se presentan las *orfs* delecionadas en los aislamientos estudiados; en gris las *orfs* presentes en LT2 y los aislados estudiados; IS26 se resalta con un borde azul. Las sombras grises mostradas conectan regiones con secuencias de nucleótidos cuya identidad varía desde el 60 al 100%, como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura.

(A) Estructura de la región *fljAB-hin* del cromosoma de la cepa bifásica de Typhimurium LT2, basada en el n° acceso AE006468.1.

(B) Estructura de las deleciones detectadas en aislamientos monofásicos de origen clínico recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018, donde n indica el número de aislamientos que comparten cada deleción.

4.1.3.1.4.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias

Utilizando la base de datos VFDB, se detectaron en todos los aislamientos 11 operones fimbriales completos: *stjABCDE*, *bcfABCDEFGH*, *fimAICDHFZYW*, *lpfABCDE*, *csgABCDEFG*, *sthABCDE*, *stiABCH*, *safABCD*, *stbABCDEF*, *stcABCD* y *stdABCD*. Se identificaron, además, todos los genes del operón *stfABCDEFGH* excepto *stfB* y *stfH*, así como los genes *steA*, *steB* y *steC* pertenecientes al operón *steABCDEFGHIJ*.

4.1.3.1.4.3. Islas de patogenicidad

La presencia de SPIs se puso de manifiesto mediante la combinación de SPIFinder y MyDBFinder, utilizando en este último caso la base de datos VFDB junto con una propia. Esta

última contiene todas las SPI descritas en *Salmonella* hasta el momento (SPI-1 a SPI-24), así como los genes que las constituyen. SPIFinder solo identificó ocho SPIs comunes a todos los aislamientos analizados (SPI-1 a 5, 9, 13 y 14) y CS54 (SPI-24). Por otro lado, la combinación de VFDB y la base de datos propia permitió reconstruir un total de 14 SPIs presentes en todos los aislamientos: SPI-1 a SPI-6, SPI-9 a SPI-14, SPI-16 y SPI-24. Cabe destacar que en todos ellos se constató la presencia de SPI-4, aunque solo en un aislamiento se detectó el gen *siiE* localizado en esta SPI. El gen *siiE* codifica una adhesina gigante de naturaleza proteica, que consta de 53 dominios repetitivos de tipo inmunoglobina bacteriana (BIg), cada uno de los cuales contiene varios residuos conservados (Barlag y Hensel, 2015). Este hecho impide el ensamblaje del gen a partir de las lecturas secuenciadas con Illumina, pero el alineamiento de dichas lecturas frente a la secuencia del gen *siiE* extraído del genoma de Typhimurium LT2 permitió demostrar su presencia en todos los aislamientos.

4.1.3.1.4.4. Otros genes de virulencia de localización cromosómica o plasmídica

En todos los aislamientos se identificaron genes de virulencia asociados a islotes de patogenicidad, entre los que se encuentran *misL*, *sinH*, *bapA*, *pagN*, *mig-5* y *mig-14*. Otros genes de virulencia encontrados fueron *phoP*, *phoQ*, *pipB2*, *sifA*, *slrP*, *sopA*, *sopB*, *sopD*, *sopD2*, *sopE2*, *sseK2* y *sspH2*. La función atribuida a los genes mencionados se muestra en la Tabla 4. También se identificaron diversos sistemas implicados en la captación de hierro entre los que se encuentran: *entCB*, *sitABCD*, *fhuABEF*, *feoABC* y los genes *fur*, *fepACDG*, *fes*, *foxA* y *mntH* así como el locus *iroBCDEN* con el gen *iroB* delecionado. Además, como ya se ha comentado anteriormente, el locus *spvABCDR* perteneciente al plásmido de virulencia pSLT de Typhimurium, fue localizado en los plásmidos IncC de la mayoría de los aislamientos analizados (ver apartado 4.1.3.1.3 de Análisis plasmídico).

4.1.3.1.4.5. Profagos

Utilizando el servidor PHASTER, en todos los aislamientos se identificaron diferentes combinaciones de profagos intactos, incompletos y/o cuestionables, cuyo número varió entre 13 y 17. Se establecieron 15 perfiles, designados con las siglas PH seguidas de un número, donde PH1 corresponde al mostrado por la cepa control LSP 389/97 (Tabla 14). Los profagos identificados como completos y el porcentaje de aislamientos en que se detectaron son los siguientes: Gifsy-2, sal3, ST104 y Edwards_GF_2 (92,9%) y Gifsy-1 (64,3%). Además, se encontraron copias incompletas y/o cuestionables de los profagos: Escher_500465, cronob_ESSI_2, sfIV y RSC47 (100%), phiE255 (57,1%), SJ46 (50%), BcepMu (42,8%), Lambda (21,4%), Entero_HK629 y Entero_HK630 (14,3%), phiPSA1, Entero_186 y sfv (7,1%),

RESULTADOS

correspondiente a un único aislamiento). Todos los aislamientos contienen uno o más profagos intactos o una combinación de copias intactas junto con otras incompletas y/o cuestionables de los mismos profagos. Cabe destacar, además, que la diversidad en el contenido de profagos fue elevada, afectando principalmente a los identificados como incompletos y/o cuestionables.

Tabla 14. Contenido en profagos detectado en los aislamientos monofásicos del clon español.

	Gifsy 1	Gifsy 2	sal3	sal5	ST104	SJ46	Escher_500465	cronob_ESSI_2	BcepMu	stV	stIV	Edward_GF_2	RCS47	phiPSA1	phiE255	Entero_HK629	Entero_HK630	Fels 1	Entero_Lambda	Entero_186	Profagos totales	Perfil PH
LSP 389/97	c/i	c/i	i/i	i	c		q	i		i		c	i/i		i			c			17	PH1
LSP 207/08	c	c	c/i		c		i/i	q			i/i	c	i/i		i	l		i			16	PH3
LSP 196/10		c/q	c/i		c	i	i/i	q	l		i	c	i								13	1
LSP 48/12		c/i	c		c		i/i	q			i/i	c	i/i		i						14	2
LSP 62/12		c	c/i		c	i	i/i	q	i		i	c	i					q			13	3
LSP 127/12	c	c	c/i		c	i	i/i	q			i/i	c	i		i	l		i		i	17	PH2
LSP 61/13	c	c	c/i		c		i/q	q		i	i		i/i		i			i	i		16	PH4
LSP 245/13		c/q	c		c		i/q	q			i/i	c	i/i		i						13	4
LSP 259/13		c	c/i		c	i	i/q	q			i	c	i		i			Q			13	5
LSP 474/14	c	c/i	c	c/q/q	c	i	i/q	q			i/i	c	i		i		i				15	PH8
LSP 2/15	c	c/q	q		c	i	i/i	q	i		i	c	i	i							16	PH5
LSP 438/15	c	c	c		c		i/i	q	i		i/i	c	i/i					Q			14	PH9
LSP 304/17	c	c	c/i		c	i	i/q	q	i		i/i	c	i					l	i		16	PH6
LSP 54/18	i/i	c	i/i		c		i/q	q			i	c	i/i		i			Q			16	PH7
LSP 148/18	c	i	c				i/q	q	i		i/i	c	i/i						i		14	1

c, profago completo; i, profago incompleto; q, profago cuestionable; PH, perfil de profagos PHASTER.

En cuanto a los genes de virulencia asociados con los profagos identificados, destaca la presencia de *sodCI*, *gvrA* y *sfrH/sseI*, todos ellos aportados por Gifsy-2, cuya función se muestra en la Tabla 5. También se detectó la presencia del gen *sopE2*, que especifica una proteína homóloga a la codificada por el bacteriófago SopEΦ, ausente en los aislamientos monofásicos. Por otro lado, aunque PHASTER identificó, en un único aislamiento, los profagos Gifsy-1 y Fels-1 como completos, no se encontraron sin embargo los genes *gipA* y *sodCIII*, previamente localizados en Gifsy-1 y Fels-1, respectivamente.

En resumen, todos los aislamientos compartieron el mismo perfil de virulencia, exceptuando el contenido en profagos y la ausencia del locus *spvABCDR* en uno de ellos (LSP 438/15).

4.1.3.1.5. Comparación de los aislamientos clínicos del periodo 2008-2014 con los obtenidos en años anteriores

La secuenciación de 23 aislamientos del periodo 1997-2007 previamente caracterizados por nuestro grupo de investigación (Guerra *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2001; García *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013) permitió corroborar los resultados obtenidos previamente, aportar nueva información y comparar ambos grupos.

Los aislamientos de 1997-2007 fueron asignados en su mayoría a los fagotipo U302, UT (coincidiendo con los de 2008-2018) y DT193 (no encontrado en años posteriores (Tabla 15)). En cuanto a la resistencia, los del periodo 1997-2007 se habían distribuido en 10 perfiles, designados R1 a R10 (Tabla 16). Casi la mitad (43,5%; 10/23) presentaron el perfil R1, que se corresponde con la heptarresistencia originalmente asociada con este clon. Llama la atención que todos los perfiles detectados en aislamientos del periodo 2008-2018 fueron diferentes a los anteriores, excepto R1 y R10, mostrados cada uno por un único aislamiento (LSP 148/18 y LSP 127/12, respectivamente). En relación a los genes de resistencia a metales pesados, todos los aislamientos de 1997-2007 presentaron una copia intacta de los operones *mer* y *sil* excepto cuatro (LSP 127/00, LSP 148/00, LSP 151/00 y LSP 411/01) y cinco (LSP 127/00, LSP 148/00, LSP 80/01, LSP 411/01 y LSP 262/02), respectivamente. Además, en todos los aislamientos excepto uno (LSP 148/00) se detectaron los genes *arsH* y *arsR2* de resistencia a organoarsenicales. Todos los aislamientos presentaron el gen *qacEΔ1*, mientras que *qacH* se encontró ausente en cuatro de ellos (LSP 127/00, LSP 148/00, LSP 73/01 y LSP 411/01).

Tabla 15. Datos generales de los aislamientos monofásicos del clon español pertenecientes al periodo 1997-2007.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Fagotipo ^c	Paciente ^d		Muestra
			Sexo	Edad	
LSP 389/97	nd	U302	nd	nd	Heces
LSP 272/98	nd	U302	nd	nd	Heces
LSP 21/00	HCN	U302	M	1	Heces
LSP 37/00	HCN	U302	M	1	Heces
LSP 40/00	nd	U302	nd	nd	Heces
LSP 127/00	HCov	U302	M	1	Heces
LSP 148/00	HUC	U302	M	2	Heces
LSP 151/00	HUC	UT	H	2	Heces
LSP 247/00	HUC	U310	H	11	Heces
LSP 417/00	HUC	U302	M	nd	Heces
LSP 41/01	HCN	DT193	M	55	Heces
LSP 66/01	HCN	DT193	M	4	Heces
LSP 73/01	HJ	DT193	H	4	Heces
LSP 80/01	HUC	DT193	M	1	Heces
LSP 84/01	HUC	DT193	H	nd	Heces

RESULTADOS

(Continuación Tabla 15)

LSP 411/01	HCN	U302	H	nd	Heces
LSP 576/01	HUC	DT193	H	nd	Heces
LSP 578/01	HUC	DT193	M	3	Heces
LSP 3/02	HCov	UT	H	1	Heces
LSP 262/02	HUC	U302	H	28	Heces
LSP 503/02	HCov	U302	M	30	Heces
LSP 718/02	HCov	U302	M	5	Heces
LSP 1142/03	HUC	U302	M	73	Heces

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, nd, no disponible; HCN, Hospital Cangas de Narcea; HCov, Hospital Covadonga; HUC; Hospital Universitario de Cabueñes; HJ, Hospital de Jario.

c, DT, Definite Type; UT, UnTypeable.

d, Sexo: M, mujer; H, hombre; nd no disponible.

En los aislamientos de 1997-2007 se encontraron de dos a cinco plásmidos, entre los que siempre se incluye un plásmido IncC (120-200 Kb). Como se demostró anteriormente (García *et al.*, 2011), en ocho aislamientos, entre ellos LSP 389/97, también se identificó el replicón IncN, localizado en los plásmidos IncC. Este replicón, sin embargo, no se detectó en ninguno de los plásmidos IncC del periodo 2008-2018. Confirmando también resultados anteriores, todos los plásmidos IncC de 1997-2007 fueron positivos para el operón *spvABCDR*, excepto LSP 272/98. Por otro lado, el análisis genómico aportó información adicional sobre el contenido plasmídico de los aislamientos de 1997-2007. Así, en un único aislamiento (LSP 1142/03) de ese periodo, se identificó un plásmido de 100 Kb del grupo de incompatibilidad IncII-I(α)-ST154, diferente del encontrado en LSP 2/15 (IncII- γ -ST259), correspondiente al periodo posterior. También se encontraron plásmidos de pequeño tamaño (entre 10,6 y 2 Kb), pertenecientes a los grupos ColE, Col(BS512), ColpVC o no identificado. Esto permitió establecer 9 perfiles plasmídicos, que se designaron teniendo en cuenta los identificados en los aislamientos de 2008-2018 (Tabla 16). Todos ellos se mantuvieron en el tiempo.

Tabla 16. Perfiles de resistencia y plásmidos, y genes de virulencia plasmídicos detectados en los aislamientos del periodo 1997-2007.

Aislamiento ^a	Perfil R	Fenotipo/ Genotipo R ^b	Perfil R	Perfil plásmidos/ Inc (Kb) ^c
LSP 389/97	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN (179,1), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 272/98	R2	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN (138), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 21/00	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-10} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC+ IncN (166,5), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 37/00	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN (167,8), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)

(Continuación Tabla 16)

LSP 40/00	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN (166,5), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 127/00	R10	SUL, TET/ [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>	P1	IncC (129), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 148/00	R10	SUL, TET/ [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>	P9	IncC (129,2) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 151/00	R1	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P3	ncC (156,8), nd* (4, 3,7 y 1,9) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 247/00	R4	CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN(173,6), nd (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 417/00	R4	CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P4	IncC (168,5), nd (14,4y 4*) y Col(BS512) (2,1)
LSP 41/01	1 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P5	IncC (168,3), nd (7,9) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 66/01	3 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>strAB</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>dfrA12</i>	P1	IncC+IncN (176,5), nd* (4) y Col(BS512) (2,1)
LSP 73/01	9 R	[AMP, AMX], [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aadA2b</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC (147,5), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 80/01	4 R	CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P6	IncC (167,5), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 84/01	7 R	[AMP, AMX], CHL, GEN, STR, SUL/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>]	P6	IncC (163,5), nd (10,6) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 411/01	1 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET , TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P1	IncC (126), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 576/01	1 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P6	IncC (168,3), nd (14,4+ 4*) y Col(BS512) (2,1)
LSP 578/01	1 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P3	IncC (161,3), nd* (3,4 y 1,9) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 3/02	1 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P2	IncC (173,4) nd* (4), Col(BS512)* (2,1) y ColpVC (1,9)
LSP 262/02	7 R	[AMP, AMX], CHL, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i>	P1	IncC (165,5) nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 503/02	2 R	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>dfrA12</i>	P2	IncC (169,1), nd* (4 y 1,9) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 718/02	R8	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>strAB</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i>	P3	IncC (159,2), nd* (4, 3,4 y 1,9) y Col(BS512)* (2,1)
LSP 1142/03	9 R	CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TET, TMP/ <i>cmiA1</i> , <i>aac(3)-IV</i> , [<i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>strAB</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	P8	IncC+IncN (183,2), IncI1-1(α) (96,4), nd* (4) y Col(BS512)* (2,1)

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, R, resistencia; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina-clavulánico; CHL, cloranfenicol; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim; TOB, tobramicina.

c, Inc, grupo de incompatibilidad; nd, no determinado; los plásmidos circularizados se indican con asterisco (*).

d, Genes de virulencia localizados en los plásmidos IncC+/- IncN.

Todos los aislamientos del periodo 1997-2007 presentaron el mismo perfil de virulencia en cuanto al contenido en genes implicados en la biosíntesis de fimbrias, genes flagelares, SPIs, y otros genes de virulencia cromosómica y plasmídica. De acuerdo con lo descrito previamente (García *et al.*, 2013), el análisis de la región *fljAB-hin* detectó dos tipos de deleciones responsables del fenotipo monofásico, $\Delta fljAB-1$ y $\Delta fljAB-2$ (ambas con solo 118 pb de STM2758 y con 500 o 270 pb de *iroB*, respectivamente). $\Delta fljAB-1$ fue la más común en aislamientos de los dos periodos, mientras que $\Delta fljAB-2$ solo se detectó en dos aislamientos de 1997-2007 y $\Delta fljAB-5$ en un aislamiento de 2008-2018.

Nuevamente, la mayor variabilidad se detectó en el contenido en profagos, encontrándose entre 14 y 17 por aislamiento, incluyendo los identificados como completos, incompletos y cuestionables (Tabla 17). Cada aislamiento presentó un perfil diferente, denominados PH1, correspondiente a la cepa control LSP 389/97, y PH16 a PH37 para el resto (ninguno de los cuales coincide con los del periodo posterior) A pesar de la elevada variabilidad, los genes de virulencia asociados a los profagos identificados fueron idénticos en los aislamientos de ambos periodos, e incluyen *sodCI*, *gvrA* y *sfrH/sseI*, todos ellos aportados por Gifsy-2, y *sopE2*, que codifica una proteína homóloga a la codificada por el bacteriófago SopE Φ . Al igual que ocurrió en los aislamientos de 2008-2018, aunque PHASTER identificó como completos los profagos Gifsy-1 y Fels-1 en 22 y 1 aislamientos del periodo 1997-2003, respectivamente, no aparecieron los genes *gipA* y *sodCIII* previamente localizados en uno y otro, respectivamente.

Tabla 17. Contenido en profagos y perfil de los aislamientos pertenecientes al periodo 1997-2007.

	Gifsy 1	Gifsy 2	sal3	sal4	sal5	SI7	ST104	SJ46	Escher_500465	cronob_ESSL_2	BcepMu	sfV	sfV	Edward_GF_2	RCS47	Entero_Pi	phiE255	Entero_HK629	Entero_HK630	Entero_HK639	Fels 1	Entero_Lambda	Entero_N15	Salmon_RE_2010	Salmon_SEN34	Total phages	Perfil de profagos	
LSP 389/97	c/i	c/i	i/i		i		c		q	i				c	i/i						c					17	PH1	
LSP 272/98	c/i	c	i/i				c		i/i	i	i	i	i	c	i								i	i	i		17	PH16
LSP 127/00	c/i	c/i/q	i/i	i			c	i	i/i	i				c													17	PH17
LSP 21/00	c	c	c/i/i		i	q	c	i	i/q					c		i	i										14	PH18
LSP 37/00	c	c/q	c/i			q	c	i	i/q		i	i	i	c		i											15	PH19
LSP 40/00	c	c			i		c	i	i/q	q	i	i		c		i			i								15	PH20
LSP 148/00	c	c	c/i				c		i/q	q	i	i	i	c	i/i												15	PH21
LSP 151/00	c	c	c/i				c	i	i/i	q		i	i	c									i	i			15	PH22
LSP 247/00	c	c	c/i	i			c	i	i/q	q		i		c									i	i			15	PH23
LSP 417/00	c	c	c/i				c		i/q	q		i	i	q	i	i	i					i		i		q	17	PH24
LSP 41/01		c	c/i				c	i	i/q	q		i	i	c	i	i	i										16	PH25
LSP 66/01	c	c/q	c/i				c	i	i/q	q	i	i	i	c	i												15	PH26
LSP 73/01	c	c/q	c/i/i				c		i/i	q		i	i	c	i	i	i										15	PH27
LSP 80/01	c		c/i				c	i	i/q	q	i	i	i	q								i	i	i/i			17	PH28
LSP 84/01	c	c	c/i		i		c	i	i/i	q	i	i		c										i			14	PH29
LPS 411/01	c	c/q	c/i				c	i	i/q	q		i	i	c		i	i										16	PH30
LSP 576/01	c	c	c/i				c		i/i	q		i	i	q	i	i	i									q	15	PH31
LSP 578/01	c	c	c/i		i		c	i	i/q	q	i	i		c													15	PH32
LSP 3/02	c	c	c/i				c	i	i/i	q	i	i	i	c													14	PH33
LSP 262/02	c	c	c/i				c	i/i	i/q	q		i	i	c										q			16	PH34
LPS 503/02	c	c/i	c/i				c	i	i/q			i	i	c	i												15	PH35
LSP 718/02	c	c	c/i/i		i		c	i	i/i	q				c	i								q				15	PH36
LSP 1142/03	c	c/q	c/i/i				c	i	i/q			i/i		c	i												15	PH37

c, profago completo; i, profago incompleto; q, profago cuestionable; PH, perfil de profagos PHASTER.

4.1.3.1.6. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos monofásicos pertenecientes al clon español

Para determinar la relación filogenética existente entre los aislamientos monofásicos del clon español secuenciados hasta la fecha en este trabajo, se construyó un árbol filogenético basado en los SNPs detectados en el genoma completo. Como se observa en la Figura 23, los 39 aislamientos incluidos en el análisis (23 de 1997-2007 y 16 de 2008-2018, con dos aislamientos de este periodo procedentes de alimentos), se encuentran estrechamente relacionados. El número de SNPs varió de uno (entre LSP 48/12 y LSP 62/12), hasta 103 SNPs (entre LSP 54/18 y LSP 148/12). Sin embargo, en el árbol se observan dos clados, A y B. El clado A agrupa 27 de los aislamientos que se diferencian en 3 y 85 SNPs, mientras que el clado B contiene los otros 12, con 1 y 57 SNPs. La cepa de referencia, LSP 389/97, se encuentra en el clado A.

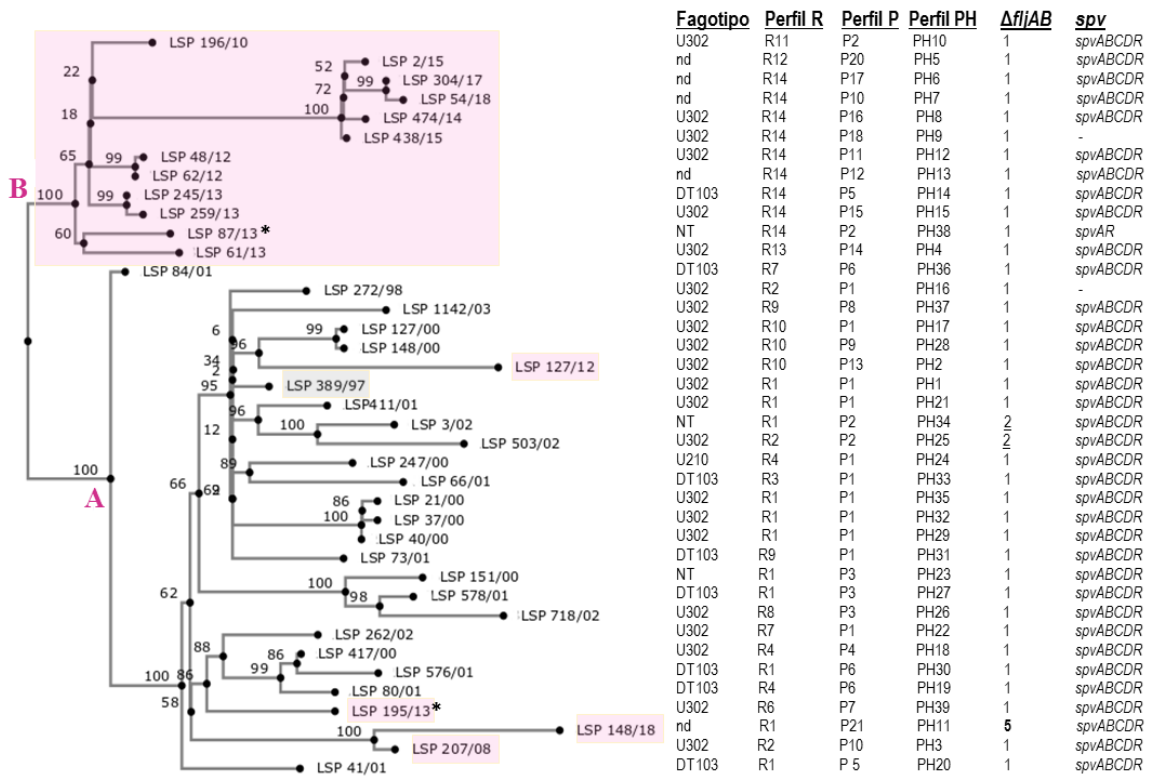


Figura 23. Árbol filogenético basado en los SNPs identificados en el genoma completo de los aislamientos monofásicos del clon español secuenciados en este trabajo utilizando como control la cepa LSP 389/97 (Anexo XI). En rosa se destacan los aislamientos pertenecientes al periodo 2008-2018 y en gris la cepa control LSP 389/97. Se indican con asterisco los aislamientos procedentes de alimentos (*). Los patrones de delección $\Delta fljAB-2$ y $\Delta fljAB-5$ se resaltan subrayados y en negrita respectivamente. Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 1000 réplicas.

4.1.3.1.7. Caracterización de plásmido pUO-STmRV1 del clon español

Como se indicó anteriormente (ver apartado 1.6.1), los aislamientos del clon español se caracterizan por presentar un plásmido de gran tamaño perteneciente al grupo de incompatibilidad IncC. pUO-STmRV1, presente en la cepa de referencia LSP 389/97, se seleccionó como representante del grupo. En esta tesis doctoral, gracias a la plataforma PacBio (apartado 3.7.1), se consiguió completar la secuencia de nucleótidos de este plásmido complejo, que ya había sido parcialmente obtenida en un trabajo anterior (P. García, Tesis Doctoral).

4.1.3.1.7.1. Sub-tipificación *in silico*

La determinación de la secuencia de nucleótidos permitió llevar a cabo la sub-tipificación *in silico* de pUO-STmRV1, siguiendo el método propuesto por Harmer *et al.* (2016). Los resultados obtenidos (Tabla 18) indican que pUO-STmRV1 podría ser un nuevo plásmido híbrido, ya que comparte características propias de los IncC de tipo 1 (presencia del gen *rhl* en la región R2, aunque en pUO-STmRV1 solo aparecen las últimas 1.317 pb del extremo 3' de

este gen cuyo tamaño es de 4.254 pb) y de los IncC de tipo 2 (inserción i2). Cabe destacar que el entorno de otras secuencias utilizadas para definir los dos tipos de plásmidos no está presente en pUO-STmRV1, debido a las extensas deleciones sufridas en su “Backbone” (Bk).

Tabla 18. Sub-tipificación por PCR *in silico* de pUO-STmRV1 y de otros plásmidos IncC.

Plásmido	Tipo IncC	i1	i2	orf	rhs	ARI-B	Nº acceso	Referencia
pR148	Tipo 1a	-	-	1832	<i>rhs1</i>	-	JX141473	del Castillo <i>et al.</i> , 2013
pSN254	Tipo 1b	-	-	1832		+	CP000604	Welch <i>et al.</i> , 2007
pR55	Tipo 2	+	+	1847	<i>rhs2</i>	+	JQ010984	Doublet <i>et al.</i> , 2012
pYR1	Hybrid	+	+	1847	<i>rhs3</i>	+	CP000602	Welch <i>et al.</i> , 2007
pUO-STmRV1	Hybrid	-(NP)	+	-(NP)	Δ <i>rhs1</i>	+	CP018220	Este trabajo

NP; el entorno de i1 y de *orf1832/orf1847* no está presente; Δ *rhs1*, solo 1.317 pb del extremo 3' del gen *rhs1* de 4.254 pb están presentes. Basado en Harmer *et al.*, (2016).

4.1.3.1.7.2. Análisis de la secuencia de nucleótidos

pUO-STmRV1 es un plásmido complejo que consta de 197.365 pb con un contenido GC promedio del 52,3%. Contiene 170 *orfs*, aproximadamente, incluyendo todas las de longitud superior a 100 nt y algunas de menor tamaño. Las *orfs* con funciones predecibles (62%) se asociaron principalmente con la biología básica del plásmido (replicación, mantenimiento y transferencia conjugativa), con virulencia y resistencia, y con múltiples elementos genéticos, incluidas secuencias de inserción intactas o defectivas (IS26, *ISEcp1*, IS440, ISCR2, IS6100, ISCR3 y ISAI), transposones truncados (Tn1721, Tn2, Tn21 y Tn5403) e integrones de clase 1 de los tipos *sull* y *sul3* (Figura 24). Cabe destacar la presencia de 14 copias de IS26, designadas IS26-1 a IS26-14, todas ellas intactas excepto IS26-12 que contiene una mutación que origina un cambio en la pauta de lectura del gen *tnpA*.

4.1.3.1.7.3. El “backbone” de pUO-STmRV1

En relación al Bk de pR148, utilizado como referencia de los plásmidos IncC (Harmer and Hall, 2015; Ambrose et al., 2018), el Bk de pUO-STmRV1 presenta tres grandes deleciones, quedando distribuido en cuatro segmentos (Bk1 a Bk4), separados por inserciones de ADN exógeno (Figuras 24 y 25). Todos los segmentos Bk aparecen en el orden y la orientación esperados, excepto Bk4 que corresponde a la región *parAB* (Ambrose et al., 2018).

La secuencia de Bk1, de 26.987 pb (distribuida en Bk1a y Bk1b en los mapas lineales mostrados en las Figuras 24 y 25, pero continua en el plásmido circular), se encuentra flanqueada por dos copias de IS26 en orientación opuesta (IS26-14 e IS26-1). Además del gen *repA*, implicado en el inicio de la replicación, Bk1a contiene los genes *ant* y *tox* (también conocidos como *ata* y *tad*) que codifican la antitoxina y la toxina de un sistema de adición plasmídica (Harmer and Hall, 2015; Hancock et al., 2017). En relación al plásmido control Bk1a muestra una amplia deleción, que incluye la ubicación de la inserción *il* de 428 pb presente en los plásmidos IncC de tipo 2 pero no en los de tipo 1. En Bk1b, también delecionado, no aparecen secuencias que codifican un regulador requerido para la activación transcripcional de genes implicados en conjugación (Carraro et al., 2014), conservando únicamente *acr2* y Δ *acaC*.

El segmento Bk2 contiene 10.671 pb (Figuras 24 y 25), en los que solamente se conservan, con respecto al plásmido control, 1.317 pb pertenecientes al extremo 3' del gen *rhs*, el cual comparte un 98% de identidad con el extremo correspondiente del gen *rhsI* de pR148 (tipo 1a). Por el contrario, únicamente las primeras 725 pb del gen *rhs* delecionado de pUO-STmRV1 coincidieron con los genes *rhs* de los plásmidos R55 (type 2) y pYR1 (híbrido), mostrando un 93,5% y 94,9% de identidad, respectivamente (47 y 37 diferencias). A continuación del gen Δ *rhs*, se localizan los genes *int*, *yacC*, *ter* y *kfrA*, seguidos por el gen *uvrD*, el cual se encuentra interrumpido por una inserción de ADN exógeno (ver más abajo).

El segmento Bk3 consta de 4.667 pb y se corresponde con parte de la región Tra2 de transferencia, la cual contiene *orfs* homólogas a los genes *traF*, *traH* y *traG* (este último truncado en el extremo 3'), todos ellos requeridos para el ensamblaje del sistema de secreción conjugativo de tipo IV.

Finalmente, el segmento Bk4 de 20.890 pb se encuentra traslocado e invertido con respecto al Bk típico de plásmidos IncC, lo que resulta en una pérdida de sintenia (Figuras 24 y 25). Bk4 contiene los genes *parA* y *parB*, implicados en la segregación del plásmido, así como una *orf* conservada (*orf053*), necesaria para la estabilidad del plásmido (Hancock et al., 2017). Esta *orf*, junto con los genes *repA*, *parA* y *parB*, se utiliza en el esquema pMLST propuesto por Hancock et al. (2017) para plásmidos IncC. También se encuentran en este segmento *traI* y *traD* de la región Tra1 de transferencia, que codifican una relaxasa del grupo MOBH-T4SS y una proteína

de acoplamiento, respectivamente. Sin embargo, otros genes de transferencia localizados la región Tra1 de los plásmidos IncC están ausentes, así como dos *orfs* de gran tamaño, *orf1832* y *orf1847*, características de los plásmidos IncC de tipo 1 y de tipo 2, respectivamente (Harmer and Hall, 2015; Ambrose *et al.*, 2018). Por el contrario, la inserción *i2* de 462 pb de los plásmidos IncC de tipo 2 sí está presente.

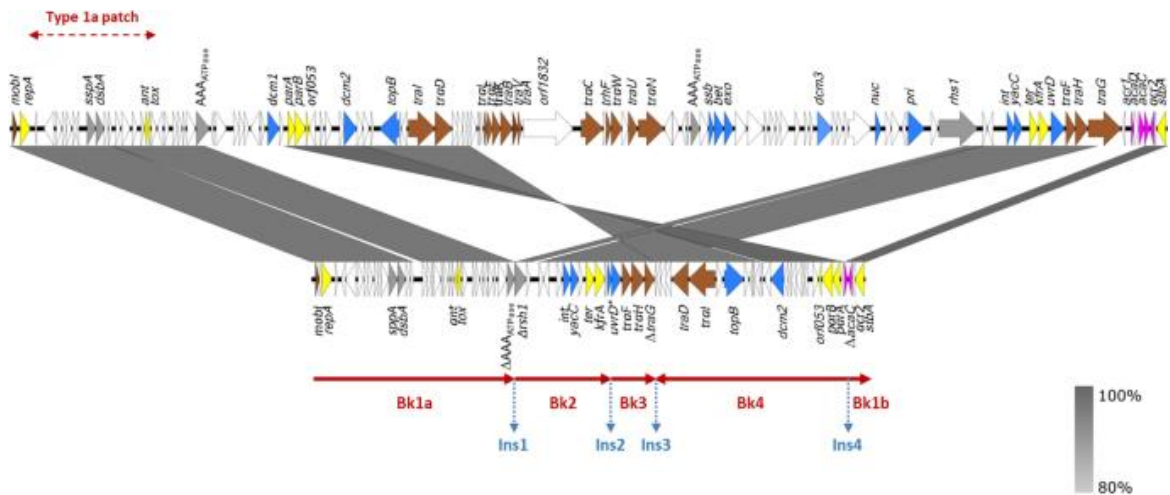


Figura 25. Comparación del “backbone” de pUO-STmRV1 con el de pR148, utilizado como referencia de los plásmidos IncC. La imagen se creó mediante Easyfig BLASTn a partir de los n°s de acceso JX141473 y CP018220. Las *orfs* se representan con flechas dispuestas en la orientación de transcripción y los colores están basados en la predicción de su función: amarillo, replicación, mantenimiento y segregación; marrón, transferencia conjugativa; azul, metabolismo del ADN; naranja, regulación de la expresión génica; gris, otras funciones; blanco, función desconocida. Las sombras grises mostradas entre los “backbones” conectan regiones con secuencias de nucleótidos cuya identidad varía desde el 80 al 100%, como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura. Se indica la localización de los segmentos de que consta el backbone de pUO-STmRV1: Bk1a y Bk1b (contiguos en el plásmido circularizado), Bk2, Bk3 y Bk4 (este último translocado e invertido respecto al segmento correspondiente en pR148). También se indica la posición de las inserciones, Ins1 a Ins4, localizadas entre ellos. El gen *uvrD*, interrumpido por la Ins2 y situado entre Bk2 y Bk3, se indica con un asterisco y se representa con dos flechas que se corresponden con los extremos 5’ y 3’. El “patch de tipo 1a” utilizado para diferenciar los plásmidos IncC de tipo 1a y de tipo 2b se muestra por encima del esqueleto de pR148 (ver apartado 4.1.3.1.7.1).

4.1.3.1.7.4. ADN exógeno adquirido por pUO-STmRV1

Casi dos tercios de la secuencia de pUO-STmRV1 consisten en ADN accesorio que proporciona genes de virulencia y genes que confieren resistencia a agentes antimicrobianos y metales pesados, distribuido en cuatro regiones, denominadas Ins1 a Ins4. El ADN exógeno representa el 69,2% (136.525 de 197.365 pb) del genoma del plásmido (Figuras 24 y 25). Las inserciones se localizan delante del gen *rhs* truncado (Ins1), dentro del gen *uvrD* (Ins2), a continuación del gen $\Delta traG$ (Ins3) y delante de *parA* (Ins4). Todas ellas se encuentran

flanqueadas o adyacentes a IS26, con copias adicionales de la misma IS intercaladas dentro de Ins1 e Ins3.

Ins1 (30.516 pb) consiste en un segmento de ADN procedente de pSLT, flanqueado por dos copias de IS26 (IS26-1 e IS26-2). A continuación, se localiza el gen *ΔtmpM* perteneciente al transposón Tn21 y un Tn1721 truncado que aporta los genes de resistencia a tetraciclina *tetR* y *tet(A)* (Figura 24). Esta región (de pSLT045 a pSLT025) contiene el operón *spv*, que codifica los principales factores de virulencia asociados a pSLT, así como los genes *ccdAB* de este plásmido que aportan un sistema toxina-antitoxina adicional.

Ins2 (10.908 Kb), se encuentra flanqueada por dos copias de IS26 (IS26-3 e IS26-4) y consiste en un segundo segmento derivado de pSLT (de pSLTΔ054 a pSLT046), el cual comprende los genes de partición *parAB*_{pSLT} y el gen de virulencia *mig5*, que codifica una anhidrasa carbónica inducida en el interior de los macrófagos.

La región Ins3 (81.581 pb), que es altamente compleja, está flanqueada por dos copias de IS26 (IS26-5 y IS26-13) y contiene siete copias internas de la misma IS (IS26-6 a IS26-12). Además, Ins3 posee genes implicados en la resistencia a metales pesados (ver más abajo), como arsénico (genes *arsR2* y *arsH*), mercurio (con una copia del operón *mer* de Tn21 intacta: *merRTPCADE* y una truncada: *merRTPC-ΔmerA*) y plata (genes *silESRCBAP*), así como genes de resistencia adicionales, la mayoría de ellos aportados por integrones de clase 1 de tipo *sull* y de tipo *sul3*, o por transposones Tn2 y Tn1721 delecionados.

Las observaciones anteriores nos llevaron a determinar la resistencia de la cepa LSP 389/97 portadora de pUO-STmRV1 a distintos metales pesados. Los resultados obtenidos se recogen en Tabla 19. De acuerdo con la presencia de los operones *mer* y *sil* en el plásmido, LSP 389/97 fue resistente a HgCl₂ y AgNO₃, con CMI de 32 μg/ml y 125 μM, respectivamente. Estos valores son 4/8 veces y 4 veces más altos que los mostrados por las cepas Typhimurium LT2 y Typhimurium ATCC 14028 utilizadas como controles. En el caso del arsénico, la toxicidad depende en gran medida de la forma química y el estado de oxidación del compuesto utilizado (Chen *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el gen *arsH* (cuya expresión está controlado por el producto del gen *arsR2*, ambos presentes en pUO-STmRV1), codifica una oxidasa organoarsenical que detoxifica derivados trivalentes de arsénico, aromáticos y metilados, oxidándolos a especies pentavalentes relativamente inocuas (Chen *et al.*, 2015; Yang and Rosen, 2016). En este trabajo se estudió la resistencia frente al óxido de fenilarsina, un compuesto aromático de As (III), utilizado como controles roxarsone, compuesto orgánico As (V), y dos compuestos inorgánicos: NaAsO₂ [As (III)] y Na₂AsHO₄ [As (V)]. De acuerdo con lo esperado, las CMI obtenidas frente a las formas inorgánicas (64 μg/ml y 128 μg/ml para NaAsO₂ y Na₂AsHO₄, respectivamente) coincidieron con las mostradas por las cepas control. Por el contrario, la CMI del óxido de fenilarsina (4 μg/ml) fue 16 veces mayor. En el caso del

RESULTADOS

roxarsone, un derivado orgánico pentavalente, relativamente inocuo, los valores de las CMI's fueron extremadamente altos para las tres cepas ensayadas.

Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa LSP 389/97 portadora del plásmido pUO-STmRV1 frente a metales pesados.

Aislamientos	CMI					
	HgCl ₂	AgNO ₃	NaAsO ₂	Na ₂ HAsO ₄	Óxido de fenilarsina	Roxarsone
LSP 389/97	32 µg/ml	125 µM	64 µg/ml	128 µg/ml	4 µg/ml	8.192 µg/ml
LT2	4 µg/ml	31 µM	64 µg/ml	128 µg/ml	0,25 µg/ml	2.048 µg/ml
ATCC 14028	8 µg/ml	31 µM	64 µg/ml	128 µg/ml	0,25 µg/ml	2.048 µg/ml

Las cepas LT2 y ATCC14028 de *S. enterica* serotipo Typhimurium se incluyeron como controles.

Además de los genes de resistencia a antibióticos y metales pesados mencionados anteriormente, Ins3 contiene también los genes *pemI* y *pemK* (un tercer sistema toxina-antitoxina, implicado en la estabilidad del plásmido R100 del grupo IncF), el gen *repA* del grupo IncN (localizado en un segmento de 965 nt que presenta un 99,17% de identidad con el ADN equivalente de R46), y un segmento de 11,2 Kb homólogo a secuencias procedentes de plásmidos IncI (que muestra una identidad del 99,1% con pR64), donde se encuentran los genes *kor* y *mck*, también implicados en estabilidad plasmídica.

Finalmente, Ins4 (13.520 pb), localizada a continuación del gen *paraA*, es una región del tipo ARI-B que contiene el gen *sul2*. ARI-B es una isla de resistencia, que se encuentra en los plásmidos IncC de tipo 1 y tipo 2, y que probablemente se haya originado a partir del elemento integrativo *GIsul2* (Nigro and Hall, 2011; Harmer *et al.*, 2017). En pUO-STmRV1 esta región se extiende desde el extremo *sul2* hasta *resG*, pero carece de otros genes presentes en *GIsul2* incluido el operón *arsHCB*. Por el contrario, a continuación del gen *resG* se detectó un segundo integrón de clase 1 de tipo *sull*, el cual carece de casetes génicas en la región variable pero contiene el gen *qacEΔ1* además de *sull* en el 3'CS (Figura 24). Cabe destacar, finalmente, que los productos de los genes *arsR2* y *arsH* de pUO-STmRV1 están estrechamente relacionados con los descritos en plásmidos del grupo IncI, como R6427, pero lejanamente relacionados con los localizados en *GIsul2*.

4.1.3.1.7.5. Análisis filogenético

Como se comentó anteriormente, el análisis de la secuencia de pUO-STmRV1, combinado con la tipificación por PCR *in silico*, lo identificó como un nuevo plásmido híbrido que comparte características de los plásmidos IncC de tipo 1 y de tipo 2 (ver apartado 4.1.3.1.7.1). Para establecer con exactitud la posición evolutiva de pUO-STmRV1, se construyó un árbol filogenético basado en los SNPs detectados en un total de 28 genes *core* conservados en 67

plásmidos IncC y en RA1 (IncA), este último utilizado como control externo (Figura 26). Los resultados revelan que pUO-STmRV1 se encuentra más estrechamente relacionado con pBML2526, un plásmido de 204.791 pb de *Providencia rettgeri*. Aparentemente, estos dos plásmidos pertenecen a un linaje antiguo, que se separó en una época temprana de pYR1 y del clado principal que agrupa al resto de plásmidos IncC. Estos últimos, se distribuyen a su vez en dos subclados. Uno de ellos comprende plásmidos de tipo 1a y el plásmido pCFSAN001921 lejanamente relacionado y previamente propuesto como un nuevo subtipo (Ambrose *et al.*, 2018). El segundo contiene plásmidos de tipo 1b y de tipo 2. La relación entre estos últimos no solo se apoya en el número relativamente bajo de SNPs que los separan, sino también en comparaciones de las secuencias correspondientes al “patch de tipo 1a” (ver Figura 24), propuesto para diferenciar los plásmidos de tipo 1a y 1b (Ambrose *et al.*, 2018). De acuerdo con su capacidad discriminativa, las comparaciones realizadas revelaron un 96,38% de identidad entre el “patch de tipo 1a” de pR148 (tipo 1a) y el ADN correspondiente en pSN254 (tipo 1b). Sin embargo, el porcentaje de identidad entre las secuencias equivalentes de pSN254 (tipo 1b) y R55 (tipo 2) fue muy superior (99,96%), de acuerdo con su agrupación en el mismo clado. La región de pUO-STmRV1 correspondiente al “patch de tipo 1a” presentó un 90,16%, 92,94%, 92,90% y 96,91% de identidad con las regiones equivalentes en pR148, pSN254, R55 y pYR1, respectivamente (el último clasificado como híbrido). Cabe señalar que, con la excepción de pYR1, los demás plásmidos IncC descritos como híbridos e incluidos en el árbol, se agruparon con plásmidos IncC de tipo 1b o de tipo 2.

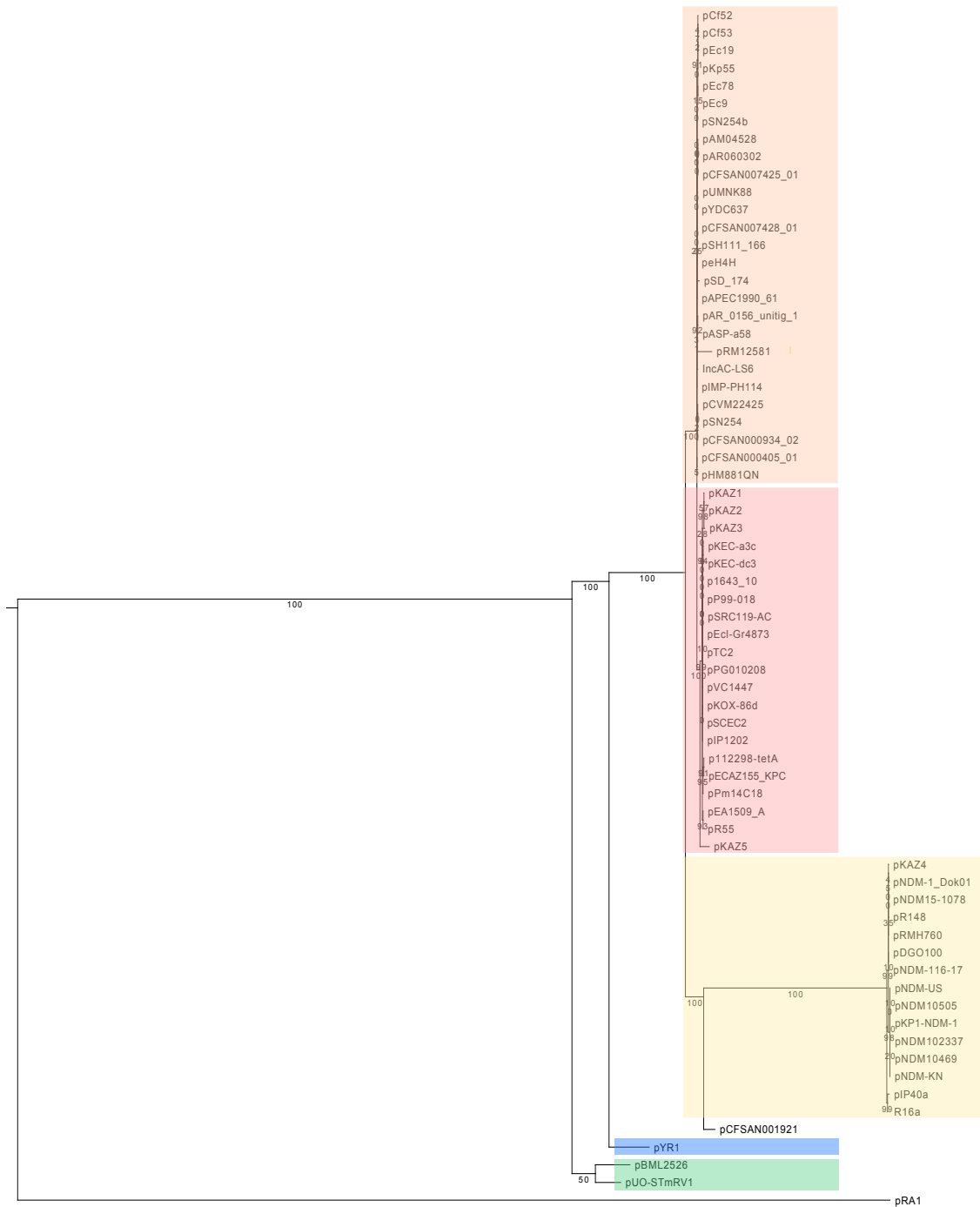


Figura 26. Relaciones filogenéticas de pUO-STmRV1. Las secuencias nucleotídicas de los 67 plásmidos IncC y de RA1 (IncA) fueron obtenidas de Genbank-NCBI (Anexo XII). El árbol está basado en 28 genes *core*, que comparten al menos 80% de identidad y 80% de cobertura y suman un total de 17.713 +/- 37 pb. Para el cálculo del bootstrap (valor indicado en los nodos del árbol) se utilizaron 100 réplicas. Los tipos y sub-tipos de los plásmidos IncC se resaltan en amarillo: tipo 1a; naranja: tipo 1b; rosa: tipo 2; azul: pYR1; verde: pUO-STmRV1 y pBML2526. Como se muestra en la matriz utilizada para construir el árbol el número de SNPs que separan a pUO-STmRV1 de pBML2526, pYR1, pR148 (tipo 1a), pSN254 (tipo 1b) y R55 (tipo 2), todos ellos IncC, y del plásmido RA1 del grupo IncA, son 78, 143, 410, 212, 215 y 1.336, respectivamente (Anexo XIII). Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 100 réplicas.

4.1.3.2. El clon sud-europeo

Otros 7 aislamientos monofásicos de origen clínico, detectados en hospitales del PA durante el periodo 2008-2018, fueron asignados al clon sud-europeo. Seis de ellos se obtuvieron de heces y uno de sangre (Tabla 20).

Tabla 20. Características generales de los aislamientos monofásicos de origen clínico pertenecientes al clon sud-europeo registrados en el Principado de Asturias durante 2008-2018.

Aislamiento ^a	Serotipo	Fagotipo ^b	Procedencia ^c	Paciente ^d		Muestra
				Sexo	Edad	
LSP 255/08	4,5,12:i-	RDNC	INS	H	2	Heces
LSP 6/12	4,5,12:i-	RDNC	HUCA	H	89	Sangre
LSP 40/12	4,12:i-	DT104	HUC	M	53	Heces
LSP 40/13	4,12:i-	DT120	HUCA	M	33	Heces
LSP 52/13	4,5,12:i-	DT18	HFJ	H	81	Heces
LSP 197/14	4,5,12:i-	DT18	HUC	M	1	Heces
LSP 64/15	4,5,12:i-	RDNC	HFJ	M	56	Heces

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, RDNC, “Reacted but Did Not Conform”; DT, Definite Type.

c, ISN, Instituto Nacional de Silicosis; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; HFJ, Hospital Fundación Jove; HUC, Hospital Universitario de Cabueñes.

d, Sexo: H, hombre; M, mujer.

4.1.3.2.1. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo

De acuerdo con la información proporcionada por el CNM, cinco y dos aislamientos presentaron la fórmula antigénica 4,5,12:i- y 4,12:i-, respectivamente. En cuanto al fagotipo, la mayoría fueron RDNC (3), asignándose el resto a DT18 (2), DT104 (1) y DT120 (1) (Tabla 20). La secuencia tipo, determinada *in silico* mediante MLST, fue ST19, coincidiendo con lo esperado para el clon sud-europeo.

4.1.3.2.2. Caracterización de la resistencia a antibióticos, metales pesados y compuestos derivados de amonio cuaternario

La determinación de la resistencia/susceptibilidad a antibióticos y de las bases genéticas responsables de las mismas permitió identificar cinco perfiles de resistencia (R1-R5). Todos ellos incluyen resistencias a tres o más compuestos pertenecientes a distintas familias, considerándose por tanto MDR (Tabla 21). El perfil mayoritario fue R3, compartido por tres aislamientos, mientras que cada uno de los otros fue presentado por un único aislamiento. Por otro lado, el gen *qacH* que confiere resistencia antisépticos derivados del amonio cuaternario se encontró en todos ellos, como parte de un integrón de clase 1 de tipo *sub3*. Finalmente, en

RESULTADOS

cuanto a metales pesados, se detectaron los genes *silEFSRCBAGP* en dos aislamientos, así como *merT* y *merR* en cuatro de ellos (Tabla 22). Aunque en este trabajo no se determinó la resistencia de estos aislamientos a metales pesados, en base a los genes encontrados, dos aislamientos podrían ser resistentes a plata/ cobre. Sin embargo, ninguno lo sería a mercurio y no se identificaron genes de resistencia a arsénico orgánico o inorgánico.

Tabla 21. Fenotipo y genes de resistencia identificados en los aislamientos pertenecientes al clon monofásico sud-europeo de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

Aislamiento ^a	Perfil R	Fenotipo/ Genotipo ^d
LSP 255/08	R1	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA2-strA-strB</i>]-[<i>sul2-sul3</i>]- <i>tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>
LSP 6/12	R2	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA2-aadA24-strA-strB</i>]- <i>sul3-tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>
LSP 40/12	R3	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA1-aadA2-strA-strB</i>]- <i>sul3-tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>
LSP 40/13	R5	AMP-CHL-STR-SUL-TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1B} - <i>cmlA1</i> -[<i>aadA1-aadA2-strA-strB</i>]- <i>sul3-dfrA12</i>
LSP 52/13	R3	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA1-aadA2-strA-strB</i>]- <i>sul3-tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>
LSP 197/14	R3	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA1-aadA2-strA-strB</i>]- <i>sul3-tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>
LSP 64/15	R4	CHL-STR-SUL-TET-TMP/ <i>cmlA1</i> -[<i>aadA1-aadA2-strB</i>]- <i>sul3-tet(B)</i> - <i>dfrA12</i>

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

Tabla 22. Genes de resistencia a metales pesados identificados en los aislamientos secuenciados del clon monofásico sud-europeo de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

	MER							SIL								QAC		
	<i>merR</i>	<i>merT</i>	<i>merP</i>	<i>merC</i>	<i>merA</i>	<i>merD</i>	<i>merE</i>	<i>silE</i>	<i>silF</i>	<i>silS</i>	<i>silR</i>	<i>silC</i>	<i>silB</i>	<i>silA</i>	<i>silG</i>	<i>silP</i>	<i>qacE1</i>	<i>qacH</i>
LSP 255/08																		
LSP 6/12																		
LSP 40/12																		
LSP 40/13																		
LSP 52/13																		
LSP 197/14																		
LSP 64/15																		

MER, mercurio; SIL, plata; QAC, derivados del amonio cuaternario.

4.1.3.2.3. Análisis plasmídico

La presencia de plásmidos se investigó mediante PBRT experimental (Anexos VIII y IX), junto con análisis *in silico* de los genomas secuenciados utilizando PlasmidFinder y PLACNETw. En todos los aislamientos se detectó un plásmido IncR de tamaño comprendido entre 117 y 150 Kb, con relaxasa de tipo MOB P1-T4SS. Se trata de plásmidos híbridos de

resistencia-virulencia, donde se localizaron todos los genes de resistencia a antibióticos y metales pesados detectados en los aislamientos, además del locus *spvABCDR* de pSLT. En algunos casos aparecieron también plásmidos crípticos de pequeño tamaño (4 a 8,7 Kb) del grupo ColE o de grupo no identificado. En conjunto, se establecieron cuatro perfiles plasmídicos (P1 a P4), sin tener en cuenta las diferencias de tamaño de los plásmidos IncR. El perfil mayoritario, P1, fue compartido por 4 aislamientos, mientras que el resto se asoció con un único aislamiento cada uno (Tabla 23).

Tabla 23. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon sud-europeo recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

Aislamiento ^a	Perfil P ^b	Tamaño de plásmido (Kb)	Contig ^c	Inc ^d	Relaxasa ^e	Proteína de replicación ^f
LSP 255/08	P2	144.185	14	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
		4.593	1*	nd	mobA/MOBP1-T4SS	ni
		4.084	1*	nd	MOBQ-T4SS	Rpt-F
LSP 6/12	P1	134.188	26	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
LSP 40/12	P3	121.425	9	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
		8.741	17	nd	mobA/MOBP1-T4SS	ni
		4.066	1*	nd	MOBQ-T4SS	Rpt-F
LSP 40/13	P4	152.269	17	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
		8.327	8	nd	mobA/MOBP1-T4SS	ni
		3.960	1	OriColE	ni	ni
LSP 52/13	P1	117.389	17	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
LSP 197/14	P1	122.825	46	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F
LSP 64/15	P1	125.033	18	IncR	nikB/MOBP1-T4SS	Rpt-F

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, P, perfil plasmídico.

c, Los plásmidos circularizados se indican con asterisco (*).

d, nd, no determinado.

e,f,g, ni, no identificado.

4.1.3.2.4. Identificación de genes y elementos genéticos implicados en virulencia

La presencia y/o ausencia de genes y elementos genéticos relacionados con virulencia se rastreó *in silico* mediante el uso de diversas herramientas bioinformáticas. Cabe destacar que todos los aislamientos del clon sud-europeo analizados en el presente trabajo compartieron el mismo perfil de virulencia, diferenciándose en el contenido en profagos.

4.1.3.2.4.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásico

En cuanto a genes flagelares se detectaron en todos ellos los operones *fliABCDEFGHIJKLMN**OPQRSTYZ*, *flgABCDEFGHIJKLMN*, *cheABMRWYZ* y *flhABCDE*

RESULTADOS

completos, así como el gen *flk* y los genes *motAB*. Por el contrario, ningún aislamiento fue positivo para el operón *fljAB*, de acuerdo con el fenotipo monofásico.

Para determinar de forma precisa las bases genéticas del fenotipo monofásico, se analizó el entorno de los genes *fljAB-hin*, usando como referencia la región correspondiente del genoma de Typhimurium LT2. Los resultados se muestran en la Figura 27. En todos los aislamientos se observó una deleción posterior al gen *hylD* (STM2692), que se inicia siempre en el mismo punto, dentro de STM2693, y se extiende hasta 10 nucleótidos después de *fljB*, afectando por tanto a los genes *fljA* y *fljB*. En todos los casos se detectó una inserción de 5.654 pb que incluye diferentes genes del fago Gifsy-2 (Δ STM1053 y STM1054), el gen *umuC* delecionado (Δ STM1997) y dos fragmentos que contienen tres genes fágicos procedentes de Fels-2 (Δ STM2703, STM2705 y STM2706). Los aislamientos que contiene esta deleción se asignaron al patrón Δ *fljAB*-1, en base a la nomenclatura previamente descrita (Arrieta-Gisasola *et al.*, 2020). Sin embargo, tres de los aislamientos analizados en este trabajo (LSP 255/08, LSP 40/12 y LSP 40/13), presentaron el gen *hin* invertido, por lo que se asignaron al patrón Δ *fljAB*-2, de nueva descripción.

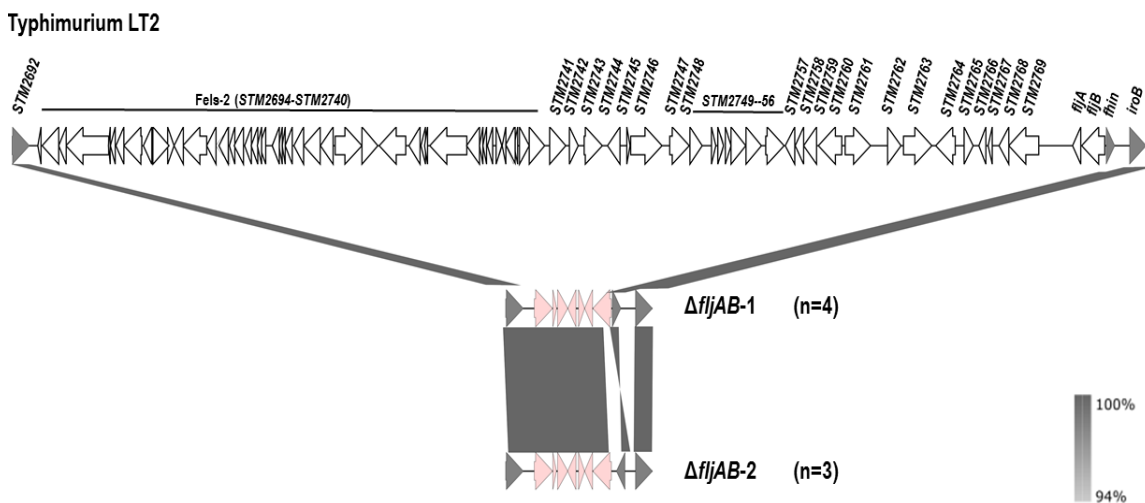


Figura 27. Caracterización de la región *fljAB-hin* en los aislamientos del clon sud-europeo analizados. Figura realizada con Easyfig BLASTn a partir de los n°s de acceso AE006468.1, JAJCUM000000000 y JAJCUN000000000, correspondientes a LT2, LSP 6/12 y LSP 255/08, respectivamente. Las *orfs* se representan con flechas dispuestas en la orientación de transcripción. En gris se resaltan los genes comunes en ambos genomas; en blanco los ausentes en los aislamientos monofásicos; y en rosa, los genes correspondientes a la inserción. Las sombras grises mostradas conectan regiones con secuencias de nucleótidos cuya identidad varía desde el 94 al 100%, como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura.

4.1.3.2.4.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias

Los 7 aislamientos del clon sud-europeo presentaron 12 operones fimbriales completos: *stjABCDE*, *bcfABCDEFGH*, *fimAICDHFZYW*, *lpfABCDE*, *csgABCDEFG*, *sthABCDE*, *stiABCH*, *safABCD*, *stbABCDEF*, *stcABCD*, *stdABCD*. Sin embargo, en el caso del operón *stfABCDEFGH*, no se encontraron los genes *stfB* y *stfH* y en relación al operón *steABCDEFGHIJ* solo aparecieron los genes *steA*, *steB* y *steC*.

4.1.3.2.4.3. Islas de patogenicidad y otros genes de localización cromosómica o plasmídica

En cuanto al contenido en islas de patogenicidad, la herramienta SPIFinder en combinación con la base de datos de creación propia, puso de manifiesto la presencia de 14 SPIs en los aislamientos analizados (SPI-1 a SPI-6, SPI9 a SPI-14, SPI-16 y SPI-24). También se detectaron otros genes de virulencia no localizados en SPIs. En concreto, todos los aislamientos fueron positivos para *misL*, *sinH*, *bapA* y *mig-5* y *mig-14* (Tabla 4). Además, se identificaron otros genes como *phoP*, *phoQ*, *pipB2*, *sifA-B*, *slrP*, *sopA*, *sopB*, *sopD*, *sopD2*, *sopE2*, *sseK1* y *sseK2* y *sppH2*, así como el locus *spvABCDR* de pSLT, presente en los plásmidos IncR (ver apartado de Análisis 4.1.3.2.3).

4.1.3.2.4.4. Profagos

Como se comentó anteriormente, la única variabilidad detectada en este apartado afectó al contenido en profagos, cuyo número osciló entre 11 y 17, incluyendo los identificados como completos, incompletos y cuestionables (Tabla 24). Todos los aislamientos presentaron copias completas de Gifsy-2 y Edward_GF2, mientras que 6 y 1 contienen, además, copias completas de sal3 (siempre acompañado por una o dos copias incompletas del mismo profago) o de Gifsy-1, respectivamente. También se encontraron copias incompletas y/o cuestionables de muchos otros profagos. En cuanto a los genes de virulencia aportados por los profagos identificados se encuentran *sodCI*, *avrA* y *sfrH/sseI*, todos ellos asociados a Gifsy-2. Sin embargo, aunque el profago Gifsy-1 solo apareció en un aislamiento (LSP 40/13), el gen *gogB* perteneciente a dicho profago se detectó en todos ellos. También se detectó el gen *sopE2* del bacteriófago SopEΦ, en todos los aislamientos.

Tabla 24. Contenido en profagos de los aislamientos monofásicos del clon sud-europeo de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium.

	Gifsy-1	Gifsy-2	sal3	sal4	Edward_GF2	Escher_500465	Salmon_SJ46	BcepMu	RCS47	Entero_P1	Fels-1	Entero_UAB_Ph20	sflV	Salmon_S17	Erwini_PEp14	Entero_ES18	Entero_HK629	Entero_HK630	Salmon_SPN9CC	phiE255	Lambda	Entero_P22	Entero_N15	Cronob_ESSI_2	Rhodoc_RER2	Cronob_vB_CsaM_GAP	Profagos totales	Perfil PH	
LSP 255/08	c	c,j	q	c	i	i	i	i	i	q																	11	PH1	
LSP 6/12	c	c,j,j		c	i	i	i	i	i	q	i	i	i	i														14	PH2
LSP 40/12	c,q	c,j	i,j	c	i	i			i						i	i			i	i	i							16	PH3
LSP 40/13	c	c		i,j	c	i	i,j				q		i						i	i	i							17	PH4
LSP 52/13	c	c,j,j		c	i		i	i,j		q	q	i	q															15	PH5
LSP 197/14	c	c,j,j		c	i			i,j		q	q	i													q	i		15	PH6
LSP 64/15	c,q	c,j,j		c	i		i,j					q	i															15	PH7

c, profago completo; i, profago incompleto; q, profago cuestionable; PH, perfil de profagos PHASTER.

4.1.3.2.5. Relaciones filogenéticas entre aislamientos monofásicos pertenecientes al clon sud-europeo

Los aislamientos monofásicos del clon sud-europeo recuperados en el PA se diferenciaron en un mínimo de cero SNPs (LSP 52/13 vs LSP 197/14) y un máximo de 144 (255/08 vs LSP 52/13 y LSP 197/14) (Figura 28). En concreto, se distribuyeron en dos clados, A y B, compuestos por 4 y 3 aislamientos, respectivamente. Curiosamente, el mismo aislamiento apareció en dos años sucesivos en dos hospitales del área sanitaria V: FHJ (LSP 52/13) y HUC (LSP 197/14), lo cual indica que, a pesar de su baja incidencia, este clon se encuentra circulando en el PA, asociado a casos esporádicos.

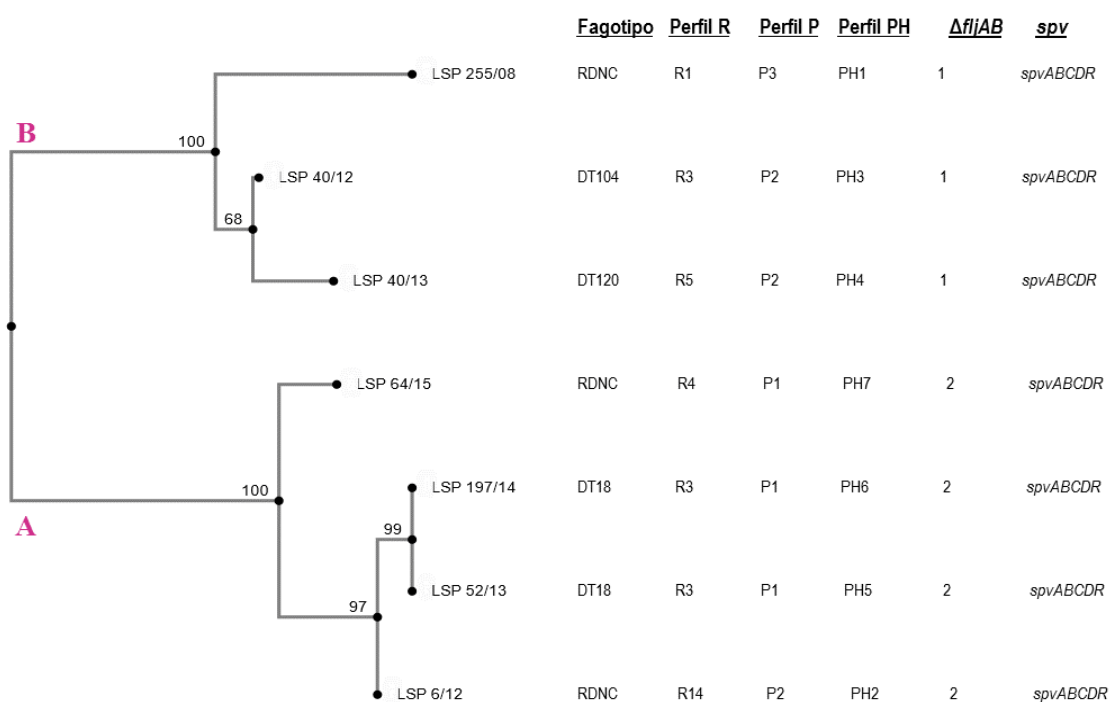


Figura 28. Relaciones filogenéticas existentes entre los aislamientos monofásicos sud-europeos del Principado de Asturias recuperados durante el periodo 2008-2018. El árbol se construyó en base a los SNPs identificados en el genoma completo de los aislamientos secuenciados en este trabajo utilizando como referencia la cepa LSP 255/08 (Anexo XIV). Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 1000 réplicas.

4.1.3.3. El clon europeo

En primer lugar, se determinó la incidencia y se llevó a cabo la caracterización general de todos los aislamientos clínicos del clon europeo obtenidos en el PA durante el periodo 2008-2018. A continuación, se secuenciaron y analizaron con mayor detalle 6 de estos aislamientos, junto con otros 7 procedentes del HUD del País Vasco, seleccionados en base a la relevancia de sus resistencias. Se secuenciaron y analizaron, además, 3 aislamientos implicados en un caso atípico de neumonía, que se produjo en 2020 en el HUCA, y otros dos correspondientes al periodo 1997-2007, previamente caracterizados por nuestro grupo (García *et al.*, 2016). Uno de los dos últimos aislamientos (LSP 207/07) se secuenció con PacBio y todos los demás con Illumina.

4.1.3.3.1. Asignación al clon europeo

Como se comentó anteriormente, el clon monofásico europeo se caracteriza por las resistencias a ampicilina, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclina, conferidas por los genes *bla*_{TEM-1b}, *strA/strB*, *sul2* y *tet(B)* de localización cromosómica. En este trabajo, la asignación inicial al clon europeo se basó en el perfil de resistencia, apoyado por la ausencia de plásmidos

propios de los clones español (IncC) y sud-europeo (IncR), característicos de los clones español y sud-europeo.

En primer lugar, la combinación de fenotipo/genotipo de resistencia (Tabla 25) sugirió que 584 de los 615 aislamientos monofásicos de origen clínico del periodo 2008-2018 (95%) podrían pertenecer al clon europeo. Destaca, sin embargo, la gran variedad de perfiles encontrados (51 en total, designados R1 a R51, incluyendo el perfil de los aislamientos recuperados en 2020). El encontrado con mayor frecuencia fue R18, compartido por 386 aislamientos (66,1%), que se corresponde con la tetrarresistencia característica del clon. Los perfiles restantes derivan del mayoritario por pérdida de una, dos o tres resistencias, por ganancia de resistencias adicionales, o por pérdida y ganancia de resistencias. Destaca la ganancia de nuevos genes que codifican resistencia frente a antimicrobianos clásicos, como ampicilina (*bla*_{TEM-1a}), aminoglicósidos [*aadA1*, *aadA2*, *aadA3*, *aac(3)-IV*, *aph(3')-Ia* y *aph(4)-Ia*], cloranfenicol (*catA1*, *cmlA1* y *floR*), tetraciclina [*tet(A)* y *tetM*], sulfonamidas [*sul1* y *sul3*] y trimetoprim (*dfrA7*, *dfrA12*, *dfrA15* y *dfrA16*). Además, de particular relevancia es la adquisición de genes de resistencia a antibióticos de elección para el tratamiento de la salmonelosis y de muchas otras enfermedades causadas por bacterias, como las cefalosporinas de tercera generación (*bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14}) y las fluoroquinolonas (*qnrA1*), o de último recurso, como la colistina (*mcr-9*). Se detectó, además, una mutación en el gen cromosómico *gyrB* (TCT a TTC, que cambia S464F), asociada al igual que *qnrA1* con resistencia a fluoroquinolonas.

Los genes identificados, que aparecen en múltiples combinaciones junto con los asociados a la tetrarresistencia, justificaron los fenotipos de resistencia determinados experimentalmente para todos los aislamientos. Dichos genes fueron detectados mediante amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos y, en algunos casos, mediante análisis bioinformático de los genomas secuenciados (Anexos VI y VII).

Tabla 25. Perfiles de resistencia (fenotipo y genes responsables) de aislamientos del clon monofásico europeo obtenidos en hospitales del Principado de Asturias durante 2008-2018.

Perfil R	Fenotipo R ^a	Genes R ^b	N
R1	AMP	<i>bla</i> _{TEM-1B}	1
R2	STR	<i>strAB</i>	2
R3	SUL	<i>sul2</i>	5
R4	TET	<i>tet(B)</i>	19
R5	AMP, STR	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i>	1
R6	AMP, SUL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i>	2
R7	AMP, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i>	10
R8	STR, TET	<i>strAB</i> , <i>tet(B)</i>	3
R9	SUL, TET	<i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	5
R10	AMP, STR, SUL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i>	28

(Continuación Tabla 25)

R11	AMP, STR, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>tet</i> (B)	4
R12	AMP, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	3
R13	STR, SUL, TET	<i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	5
R14	[AMP, AMX], TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet</i> (B)	3
R15	[AMP, AMX], STR, SUL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i>	3
R16	AMP, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	4
R17	AMP, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	2
R18	AMP, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	386
R19	AMP, KAN, STR, SUL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i>	1
R20	AMP, KAN, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	1
R21	[AMP, AMX], STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	28
R22	AMP, KAN, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	8
R23	[AMP, AMX], SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	1
R24	AMP, STR, SUL, TET, COL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>mcr-1</i>	2
R25	AMP, STR, SUL, TET, NAL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>ni</i>	1
R26	CTX, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i> , [<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (A)], <i>dfrA16</i>	1
R27	AMP, CHL, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , [<i>cmiA1</i> , <i>floR</i>], [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>], <i>sul2</i> , [<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (M)], <i>dfrA12</i>	1
R28	AMP, CHL, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmiA1</i> , [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>], <i>sul2</i> , [<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (M)], <i>dfrA12</i>	1
R29	AMP, KAN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	1
R30	AMP, CHL, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , [<i>cmiA1</i> , <i>floR</i>], [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>], <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	1
R31	AMP, [GEN, KAN], STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , [<i>ni</i> , <i>ni</i>], <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	1
R32	[AMP, AMX], STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	1
R33	[AMP, AMX], STR, SUL, TET, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>ni</i>	2
R34	AMP, STR, SUL, TET, NAL, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>ni</i> , <i>ni</i>	8
R35	AMP, CHL, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmiA1</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	3
R36	AMP, [CTX, FEP], STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B)	2
R37	AMP, PTZ, STR, SUL, TET, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (B), <i>gyrB</i> (S464F)	3 ^d
R38	AMP, CHL, KAN, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmiA1</i> , <i>aph</i> (3')-Ia, [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA3</i>], [<i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet</i> (B)	1
R39	[AMP, AMX], CHL, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmiA1</i> , [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>], [<i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i>	1
R40	AMP, CTX, KAN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aph</i> (3')-Ia, [<i>strAB</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], [<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (A)], <i>dfrA16</i> , <i>mcr-9</i>	5
R41	AMP, CHL, KAN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA1</i> -like	1
R42	AMP, CTX, GEN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aac</i> (3')-IIa, [<i>strAB</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], [<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)], <i>dfrA16</i> , <i>mcr-9</i>	1
R43	[AMP, AMX], [CTX, FEP], KAN, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aph</i> (3')-Ia, [<i>strAB</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], [<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)], <i>dfrA16</i> , <i>mcr-9</i>	1
R44	[AMP, AMX], CTX, KAN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aph</i> (3')-Ia, [<i>strAB</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA16</i> , <i>mcr-9</i>	3
R45	[AMP, AMX], CHL, KAN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>floR</i> , <i>aph</i> (3')-IIa, [<i>strAB</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA3</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], [<i>tet</i> (B), <i>tet</i> (M)], <i>dfrA12</i>	1
R46	[AMP, AMX], CHL, [GEN, TOB], STR, SUL, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>ni</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>dfrA12</i>	1
R47	[AMP, AMX], [CTX, FEP], GEN, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>aac</i> (3')-IIa, [<i>aadA2b</i> , <i>strAB</i>], [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], [<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)], <i>dfrA16</i> , <i>mcr-9</i>	1
R48	AMP, CHL, [GEN, KAN, TOB], STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>ni</i> , <i>ni</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA1</i> -like	5
R49	AMP, CHL, GEN, STR, SUL, TET, TMP, NAL, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>dfrA12</i> , <i>ni</i> , <i>ni</i>	1
R50	[AMP, AMX], CHL, [GEN, KAN], STR, SUL, TET, NAL, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>aac</i> (3')-IV, <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>ni</i> , <i>ni</i>	1
R51	AMP, CHL, [GEN, KAN, TOB], STR, SUL, TET, NAL, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet</i> (B), <i>ni</i> , <i>ni</i>	1

R, resistencia.

a, AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina-clavulánico; CTX, cefotaxima; CEP, cefepima; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacino; COL, colistina; FOX, cefoxitina; NAL, ácido nalidíxico; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; PTZ, piperacilina-tazobactam; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TOB, tobramicina; TMP, trimetoprim.

b, ni, no identificado.

c, N, número de aislamientos que presentan cada perfil R.

d, Aislamientos de 2020 implicados en un caso atípico de neumonía que tuvo lugar en el HUCA.

4.1.3.3.2. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo

Como se comentó anteriormente, el serotipo y también el fagotipo hasta el año 2016, se determinó en el CNM. Los precedentes de hospitales del PA durante el periodo 2008-2018, presentaron las fórmulas antigénicas 4,5,12:i:- (420) y 4,12:i:- (162), mientras que en seis aislamientos la fórmula antigénica precisa se desconoce. El fagotipo se determinó para 373 aislamientos. El más frecuente fue DT138 (27,3%), seguido de PNR (20,5%), DT193 (13,1%), DT195 (9,2%), U311 (7,5%), DT120 (6,7%), DT104B (4%), DT22 (2,9%), DT104 (2,9%), DT7a (2,4%), U302 (1,9%), DT7, DT18, DT10, DT56, DT208 y U323 (cada uno de estos últimos asociado a un único aislamiento, 1,6%). Otros 29 no pudieron ser tipificados con la colección de fagos utilizada (UT), mientras que el fagotipo no fue determinado para los 186 posteriores a 2016. Finalmente, la secuencia tipo solo se determinó para 16 aislamientos clínicos cuyo genoma fue secuenciado (ver apartados 4.1.3.3.5 y 4.1.3.3.6). Todos ellos presentaron los alelos *aroC10*, *dnaN19*, *hemD12*, *hisD9*, *purE5*, *sucA9* y *thrA2* de los siete genes conservados del esquema MLST. Esta combinación corresponde a la secuencia tipo ST34, que es la esperada para el clon europeo.

4.1.3.3.3. Análisis plasmídico

Mediante la técnica de Kado y Liu (1981) se detectó la presencia de uno o más plásmidos de diferentes tamaños en 365 de los 584 aislamientos asignados al clon europeo. La tipificación experimental de los plásmidos utilizando el esquema PBRT identificó los replicones correspondientes a los grupos de incompatibilidad IncHI2, IncX4, IncHI1, IncFIB, IncII e IncY en 35, 2, 5, 6, 1 y 1 aislamientos, respectivamente, mientras que el grupo de incompatibilidad de 19 plásmidos no pudo ser identificado. Tampoco se tipificaron experimentalmente los plásmidos de pequeño tamaño (entre 2-14 Kb aproximadamente), detectados solos o en combinación con otro(s) de mayor tamaño. Ningún aislamiento fue positivo para el replicón IncFIIs, característico del plásmido de virulencia pSLT, ni tampoco para los grupos IncC e IncR, asociados a los clones español y sud-europeo, respectivamente.

4.1.3.3.4. Análisis genómico de dos aislamientos del periodo 1997-2007

Como se comentó anteriormente, en este trabajo se secuenciaron dos aislamientos del clon europeo que habían sido caracterizados experimentalmente por nuestro grupo (P. Garcia, Tesis Doctoral), uno de ellos con Illumina (LSP 45/00) y otro con SMRT-PacBio (LSP 207/07). El análisis *in silico* confirmó los resultados experimentales y aportó información adicional. Los datos relativos al hospital de origen, paciente y muestra de procedencia, así como la fórmula antigénica, fagotipo, secuencia tipo, perfil de resistencia a antibióticos y perfil plasmídico se presentan en la Tabla 26. Por otro lado, el análisis *in silico* permitió determinar la estructura de la región RR, donde se localizan los genes *bla*_{TEM-1B}, *strA*, *strB*, *sul2* y *tet(B)* responsables de la tetrarresistencia compartida por ambos aislamientos, y establecer, a la vez, las bases genéticas del fenotipo monofásico. Además, permitió conocer el contenido y contexto genético de los determinantes de resistencia a metales pesados.

Tabla 26. Características generales, genotipo y genes de resistencia de los aislamientos control del clon europeo.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Muestra	Paciente ^c		Serotipo	Fagotipo	ST	Fenotipo/ Genotipo R ^d
			Sexo	Edad				
LSP 45/05	HVN	Heces	H	4	4,5,12:i:-	U311	ST34	AMP, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>
LSP 207/07	HUCA	Heces	H	nd	4,5,12:i:-	U311	ST34	AMP, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, HVN, Hospital Valle del Nalón; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias.

c, Sexo: H, hombre; Edad: nd, no disponible.

d, R, resistencia; AMP, ampicilina; STR, estreptomycin; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina.

4.1.3.3.4.1. Organización de la región RR y bases genéticas del fenotipo monofásico

La estructura de las regiones RR de LSP 45/00 y LSP 207/07 se muestra en la Figura 29. La segunda se obtuvo totalmente ensamblada, ya que el genoma de LSP 207/07 fue secuenciado con SMRT-PacBio. Por el contrario, la de LSP 45/00, secuenciada con Illumina, se distribuyó en nueve contigs, que fueron posteriormente ensamblados mediante amplificación por PCR seguida de secuenciación Sanger.

De acuerdo con lo previamente descrito para la cepa 105/7/03 (Lucarelli *et al.*, 2010), tanto la RR de LSP 207/07 como la RR de LSP 45/00 constan de dos módulos: RR1 y RR2 (Figura 29). En ambos casos, el primer módulo es idéntico al RR1 de 105/7/03. Además, en los tres aislamientos, este módulo se encuentra flanqueado a la izquierda por Δ STM2753 y a la derecha por Δ STM2759 a Δ STM2753, invertidas en relación al cromosoma de LT2. Sin embargo, tanto

LSP 207/07 como LSP 45/00 contienen, a continuación, *orfs* adicionales, que difieren entre sí (Δ STM2759 a Δ STM2761 separadas de las anteriores por una copia de IS26 en LSP 207/07 y el gene *hin* flanqueado por dos copias de IS26 en orientación opuesta, en LSP 45/00). El módulo RR2, que aparece a continuación, es diferente en los tres aislamientos comparados. En LSP 207/07, se encuentra invertido en relación al de 105/7/03 y, además, carece de los genes de resistencia a mercurio. En LSP 45/00 contiene el locus *mer* pero también se encuentra invertido en relación a la cepa control. Tanto en LSP 207/07 como en LSP 45/05, la inserción de la región RR (que se encuentra flanqueada por dos copias de IS26 en orientación opuesta y contiene copias internas de esta misma IS), se asocia a la delección de varias *orfs* cromosómicas, entre las que se incluyen los genes *fljA*, *fljB* e *hin* en LSP 207/07 (para mayor detalle ver Figura 30) y los genes *fljA* y *fljB* en LSP 45/00 que, sin embargo, conserva el gen *hin* en la región cromosómica localizada entre RR1 y RR2. A diferencia de estos aislamientos, la delección causante del fenotipo monofásico de 107/7/03, no se asocia a la inserción de RR sino de una única copia de IS26 (Lucarelli *et al.*, 2012).

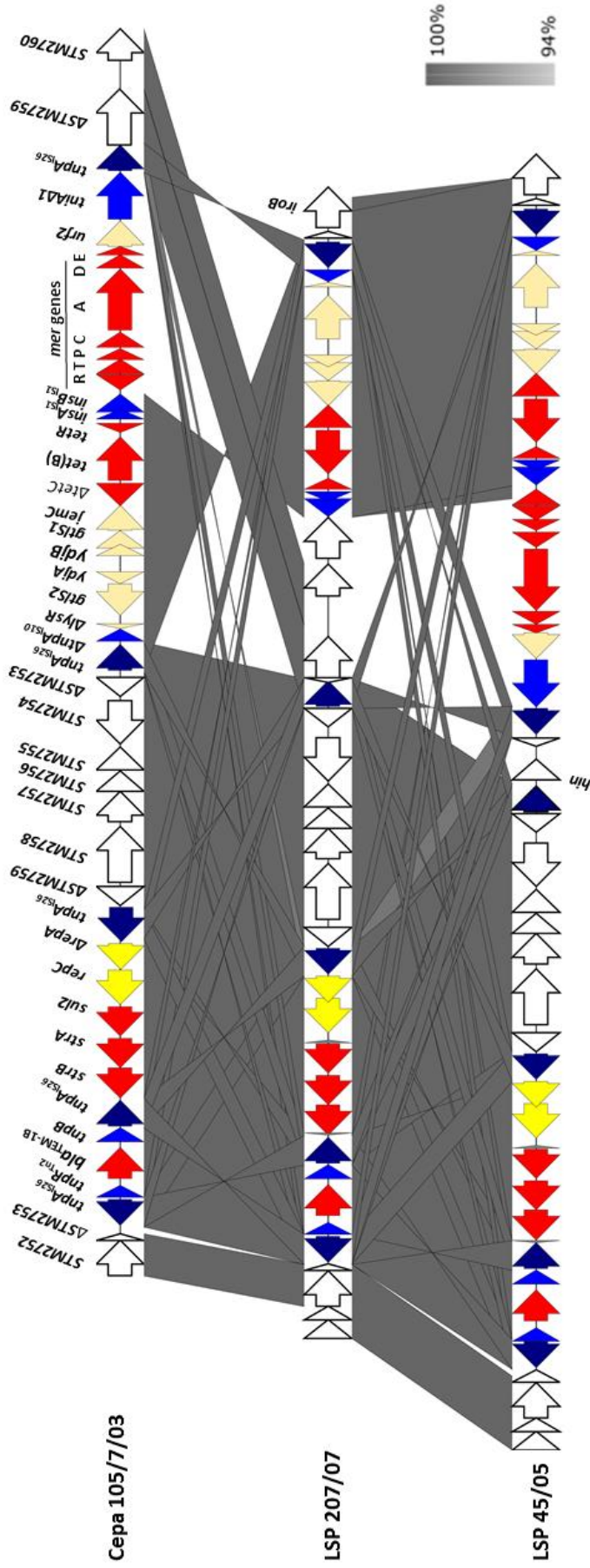


Figura 29. Organización genética de las regiones de tetrarresistencia encontradas en los aislamientos control del clon monofásico europeo. El alineamiento se creó con EasyFig BLASTn, incluyendo como referencia las regiones de tetrarresistencia de las cepas 105/7/03 (nº de acceso HQ331538, que se muestra arriba) y 07-2006 (nº de acceso KR856283; que se muestra abajo). Las *orf*s se representan con flechas que apuntan en la dirección de transcripción y tienen diferentes colores en base de su origen o función: blanco, *orf*s del cromosoma Typhimurium LT2 (denominadas de acuerdo al nº de acceso NC_003197); rojo, resistencia; azul, movilidad del ADN; con el gen *tnpA* de IS26 resaltado en azul oscuro; amarillo, genes de replicación plasmídicos; naranja pálido, otras funciones. Los sombreados gris indican una homología entre el 94 y el 100% entre las secuencias conectadas, como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura.

4.1.3.3.4.2. Resistencia a metales pesados

La secuenciación de los genomas de LSP 207/07 y LSP 45/05 también permitió establecer la estructura de SGI-4, el ICE del clon europeo donde se acumulan genes de resistencia a metales pesados (Figura 31). Mediante análisis *in silico* se comprobó que las SGI-4 de los dos aislamientos son idénticas entre sí (la de LSP 45/00 apareció ensamblada en un único contig) e idénticas también a las encontradas en otros aislamientos del clon europeo secuenciados en esta tesis (ver más adelante) o por otros autores. Los genes de resistencia a metales pesados se distribuyen en dos regiones. Una de ellas contiene genes *ars* de resistencia a arsénico inorgánico (*arsRSD2A2BCAID1*), mientras que en la otra se localizan genes *sil* de resistencia a plata y cobre (*silESRCFBAGP*), junto con genes *pco* de resistencia a cobre (*pcoGEIABCDRSE2*). SGI-4 posee, además, genes (*tra*) y otros genes necesarios para su movilización por conjugación. Además, el sitio de inserción del elemento ICE, entre STM4320 e *yjdC* (ambos codifican reguladores transcripcionales putativos), también coincide con información previamente descrita.

La detección de numerosos genes de resistencia a metales pesados, tanto en LSP 207/07 como en LSP 45/05, nos llevó a determinar la CMI de los mismos, utilizando Typhimurium LT2 y ATCC 14028 como controles negativos (Tabla 27). De acuerdo con la presencia del locus *mer* en LSP 45/00 pero no en LSP 207/07, la CMI del HgCl₂ para el primer aislamiento fue dos veces superior a la obtenida para LSP 207/07 y ATCC 14028 y cuatro veces superior a la de Typhimurium LT2. Por otro lado, tanto LSP 207/07 como LSP 45/05 fueron resistentes a AgNO₃ con una CMI de 0,125 µg/ml, valor claramente mayor al de las cepas control. De la misma manera, la CMI del NaAsO₂ y del Na₂HAsO₄ de los dos aislamientos fue 5 y 6 veces superior a la de Typhimurium LT2 y ATCC 14028, respectivamente. De momento, la resistencia al cobre no ha podido ser aún investigada.

Tabla 27. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de LSP 45/05 y LSP 207/07 frente a metales pesados.

Aislamientos	CMI			
	HgCl ₂	AgNO ₃	NaAsO ₂	Na ₂ HAsO ₄
LSP 45/05	16 µg/ml	125 µM	2.048 µg/ml	8.192 µg/ml
LSP 207/07	8 µg/ml	125 µM	2.048 µg/ml	8.192 µg/ml
LT2	4 µg/ml	31 µM	64 µg/ml	128 µg/ml
ATCC 14028	8 µg/ml	31 µM	64 µg/ml	128 µg/ml

Las cepas LT2 y ATCC 14028 de *S. enterica* serotipo Typhimurium se incluyeron como controles.

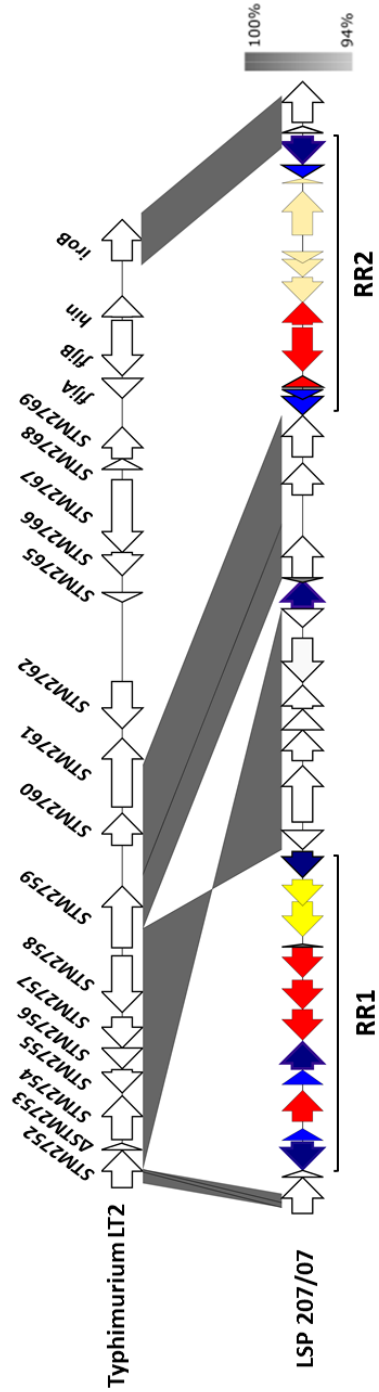


Figura 30. Caracterización de la región *fliAB-hin* en el aislamiento LSP 207/07. Figura realizada con Easyfig BLASTn a partir de los n°s de acceso AE006468.1 y VCMG00000000, correspondientes a LT2 y LSP 207/07, respectivamente. Las *orf*s se representan con flechas dispuestas en la orientación de transcripción. En gris se resaltan los genes comunes en ambos genomas; en blanco los ausentes en los aislamientos monofásicos; y en rosa, los genes correspondientes a la inserción. Las sombras grises mostradas conectan regiones con secuencias de nucleótidos cuya identidad varía desde el 94 al 100%, como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura.

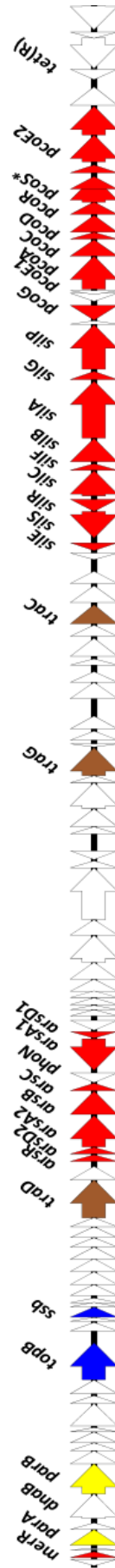


Figura 31. Organización genética de la SGI-4 encontrada en los aislamientos control del clon europeo. Las *orf*s se representan con flechas que apuntan en la dirección de transcripción y tienen diferentes colores en base de su origen o función: blanco, *orf*s del cromosoma Typhimurium LT2 (denominadas de acuerdo al n° de acceso NC_003197); rojo, resistencia a metales pesados; azul, movilidad del ADN; amarillo, genes de replicación plasmídicos; marrón, genes de conjugación plasmídicos.

4.1.3.3.4.3. Identificación de genes y elementos genéticos implicados en virulencia

Finalmente, la secuenciación de los genomas permitió establecer el contenido en genes de virulencia.

4.1.3.3.4.3.1. Genes implicados en la biosíntesis de flagelos: Bases genéticas del fenotipo monofásico

En cuanto a los flagelos, se detectaron los operones completos *fliABCDEFGHIJKLMN**OPQRSTYZ*, *flgABCDEFGHIJKLMN*, *cheABMRWYZ* y *flhABCDE*, así como el gen *flk* y los genes *motAB*. Como se comentó anteriormente, en ninguno de los dos aislamientos se detectó el operón *fljAB*, de acuerdo con el fenotipo monofásico, mientras que *hin* se mantiene en LSP 45/05 pero no en LSP 207/07.

4.1.3.3.4.3.2. Genes implicados en la biosíntesis de fimbrias

En ambos aislamientos se identificaron 12 operones fimbriales intactos o parcialmente completos (*stjABCDE*, *bcfABCDEFGH*, *fimAICDHFZYW*, *lpfABCDE*, *csgABCDEFG*, *sthABCDE*, *stiABCH*, *safABCD*, *stbABCDEF*, *stcABCD*, *stdABCD* y *stfACDEFG*, faltándole a este último los genes *stfB* y *stfH*). Además, se identificaron los genes *steA*, *steB* y *steC* pertenecientes al operón *steABCDEFGHIJ*.

4.1.3.3.4.3.3. Islas de patogenicidad y otros genes de localización cromosómica o plasmídica

La combinación de SPIFinder y una base de datos propia permitió identificar 14 SPIs (SPI-1 a 6, SPI-9-14, SPI-16 y SPI-24) en ambos aislamientos. Además, al igual que en los aislamientos pertenecientes a los clones español y sud-europeo, también se encontraron otros genes de virulencia sueltos o asociados a islotes de patogenicidad y plásmidos: *misL*, *sinH*, *bapA* y *pagN*, *mig-14*, *phoP*, *phoQ*, *pipB2*, *sifA*, *slrP*, *sopA*, *sopB*, *sopD*, *sopD2*, *sopE2*, *sseK1*, *sseK2* y *sspH2*. En ninguno de ellos se encontró el locus *spv* de pSLT.

4.1.3.3.4.3.4. Profagos

En LSP 45/05 y LSP 207/07 se identificaron 11 y 13 profagos, respectivamente (Tabla 28), incluyendo copias intactas de Gifsy-1 y *sal3*, junto con copias incompletas y/o cuestionables de un número variable de profagos, en ambos aislamientos, así como una copia intacta de Gifsy-2

en LSP 207/07. Los perfiles detectados fueron diferentes entre sí, y en relación a los encontrados en los clones español y sud-europeo. Sin embargo, a pesar de la alta variabilidad, el contenido en genes de virulencia asociados a profagos fue idéntico en todos los aislamientos de los tres clones, incluyendo *sodCI*, *gvrA* y *sfrH/ssel* de Gifsy-2 y gen *sopE2*.

Tabla 29. Contenido en profagos y perfiles de LSP 45/05 y LSP 207/07.

	Gifsy-1	Gifsy-2	sal3	Entero_HK630	Cronob_vB_CsaM_GAP32	sflV	phiE255	Cronob_ESSI_2	RSC47	Escher_500465	BcrpMu	Fels-1	Profagos totales	Perfil PH
LSP 45/05	c,i	i	c,i			i		q	i	q	i	q	11	PH1
LSP 207/07	C	c,q	c,i	i	i	l	i	q	i	i,q			13	PH2

c, profago completo; i, profago incompleto; q, profago cuestionable; PH, perfil de profagos PHASTER.

4.1.3.3.5. Aislamientos ST34 resistentes a cefotaxima

4.1.3.3.5.1. Origen de los aislamientos

En este trabajo también se llevó a cabo el análisis genómico de 13 aislamientos del clon europeo procedentes de dos hospitales del PA (HUCA;7 y HUC; 6) y de un hospital del País Vasco (HUD; 7), seleccionados en base a su resistencia a cefotaxima (Tabla 29). Fueron recuperados a partir de muestras clínicas, en concreto heces (11) y orina (2).

4.1.3.3.5.2. Caracterización general de los aislamientos

De acuerdo con la información aportada por el CNM a través del LSP, 5 de los 6 aislamientos del PA presentaron el serotipo 4,5,12:i:-, mientras que la fórmula antigénica de uno de ellos se desconoce. El fagotipo, determinado únicamente para cuatro aislamientos, fue DT138 (LSP 126/12 y LSP 132/12), DT193 (LSP 236/14) y U302 (LSP 149/15). Finalmente, mediante SeqSero se confirmó el carácter monofásico de todos los aislamientos, incluidos los del País Vasco, y todos se asignaron a ST34. mediante MLST *in silico*.

Los 13 aislamientos fueron MDR, ya que mostraron resistencia a antibióticos de cinco a ocho familias diferentes (Tabla 29). 10 aislamientos compartieron el patrón tetrarresistente (ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina) conferido por los genes *bla*_{TEM-1B}, *strA-strB*, *sul2* y *tet(B)* de localización cromosómica, característico del clon europeo. Otros tres portaban solo *bla*_{TEM-1B} y *tet(B)* (un aislamiento) o solo *tet(B)* (dos aislamientos). Se encontraron, además, numerosos genes adicionales: *floR* (cloranfenicol; 1 aislamiento), *aadA2b*

(estreptomicina; 12), *ant(2'')-Ia* (estreptomicina; 2), *aph(3')-Ia* (kanamicina; 5), *sulI* (sulfonamidas; 12), *tet(A)* (tetraciclina; 6); *dfrA16* (trimetoprim; 1), de resistencia a antibióticos de uso tradicional, así como *bla_{CTX-M-9}* y *bla_{CTX-M-14}*, de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro (encontrados en 11 y 2 aislamientos, respectivamente), *qnrA1*, de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas (2 aislamientos) y *mcr-9* de resistencia plasmídica a colistina (5 aislamientos), aunque este gen no se expresa en *S. enterica*. Todos los genes adicionales, excepto *floR*, se localizaron en plásmidos de varios grupos de incompatibilidad. El número de plásmidos detectado por aislamiento varió entre uno y cinco.

Tabla 29. Características de los aislamientos ST34 recuperados en hospitales del Principado de Asturias y País Vasco.

Aislamiento ^a	Fórmula antigénica SeqSero (Experimental)	Paciente Sexo/edad	Origen	Fenotipo de resistencia ^b	Genes de resistencia	Localización ^c (plásmidos crípticos)
HUD 1/12	4:i-	H/5	Heces	AMP, CTX, [STR, KAN], SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>blaTEM-1B</i> , <i>aph(3)-Ia</i> , <i>nd*</i> (4.072) <i>ColE*</i> (3.830)	Cromosoma InCH12 (348.603) nd* (4.072) ColE* (3.830)
HUD 2/12	4:i-	M/10	Heces	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>]	Cromosoma InCH12 (341.594) ColE* (3.820)
HUD 3/12	4:i-	H/9	Heces	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP, CIP	<i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>tet(A)</i> , <i>qnrA1</i>	Cromosoma InCH12 (270.777)
LSP 126/12 (HC)	4:i- (4.5,12:i-)	M/64	Heces	AMP, CTX, [STR, KAN], SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>aph(3)-Ia</i> , <i>mcr-9</i>	Cromosoma InCH12 (316.910) ColE (5.125) nd (4.561)
LSP 132/12 (HC)	4:i- (4.5,12:i-)	H/67	Heces	AMP, CTX, [STR, KAN], SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>aph(3)-Ia</i> , <i>mcr-9</i>	Cromosoma InCH12 (315.272) ColE (7.755) ColE (5.804) nd (5.114)
HUD 2/14	4:i-	M/78	Heces	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>tet(A)</i>	Cromosoma InCH12 (263.144)
HUD 3/15	4:i-	H/3	Heces	AMP, CTX, [STR, GEN], SUL, TET	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , Δ <i>lnf60</i> [<i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>ant(2'')</i> -Ia	Cromosoma InCH12 (333.957)
HUD 1/16	4:i-	M/9	Heces	AMP, CTX, CHL, [STR, KAN], SUL, TET, TMP, CIP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>floR</i> , <i>ant(2'')</i> -Ia, <i>tet(A)</i> , <i>qnrA1</i>	Cromosoma InCH12 (282.885)
HUD 2/16	4:i-	H/8	Heces	AMP, CTX, SER, SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>]	Cromosoma InCH12 (249.570)
LSP 323/17 (HUCA)	4:i- (4.5,12:i-)	H/2	Heces	CTX, STR, SUL, TET, TMP	<i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>tet(A)</i> , <i>mcr-9</i>	Cromosoma InCH12 (293.486)
LSP 210/18 (HUCA)	4:i-	M/82	Orina	AMP, CTX, [STR, KAN], SUL, TET, TMP	<i>blaTEM-1B</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> <i>blaCTX-M3</i> , <i>lnf60</i> [<i>dfrrA16</i> , <i>aadA2b</i> , <i>sul1</i>], <i>aph(3)-Ia</i> , <i>tet(A)</i> , <i>mcr-9</i>	Cromosoma InCH12 (294.353) nd (5.387) ColE (4.241) nd* (2.042)

(Continuación Tabla 29)

LSP 236/14 (HUCA)	4i- (4,5,12i-)	M/11	Heces	AMP, CTX, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>su12</i> , <i>tet</i> (B) <i>bla</i> _{ACTX-M14}	Cromosoma Ind1 (97.928) nd (11.172)
LSP 149/15 (HUCA)	4i- (4,5,12i-)	H/11	Heces	AMP, CTX, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>su12</i> , <i>tet</i> (B) <i>bla</i> _{ACTX-M14}	Cromosoma Ind1 (97.465) ColpVC (10.861)

a, HUD, Hospital Universitario de Donostia (País Vasco); LSP, Laboratorio de Salud Pública; HC, Hospital de Cabueñes; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias.

b, Sexo: H, hombre; M, mujer.

c, AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacino; COL, colistina; FOX, cefoxitina; GEN gentamicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomycin; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

e, nd, no determinado.

4.1.3.3.5.3. Regiones cromosómicas que codifican resistencia a metales pesados y antibióticos: Bases genéticas del fenotipo monofásico

Las regiones de resistencia a metales pesados y antibióticos, SGI-4 y RR, se caracterizaron en los 13 los aislamientos resistentes a cefalosporinas. SGI-4 que, como se comentó anteriormente, contiene los genes *arsRSD2A2BCA1D1*, *silESRCFBAGP* y *pcoGE1ABCDRSE2*, de resistencia a arsénico inorgánico, plata/cobre y cobre, respectivamente se encontró en 10 de los 13 aislamientos, pero no en los 3 restantes (HUD 2/14, HUD 3/15 y LSP 323/17, este último del HUCA). SGI-4 fue idéntica en todos aquellos donde se detectó, coindiendo también con las descritas previamente en este trabajo (apartado 4.1.3.3.4.2) y con encontradas en muchos otros aislamientos del clon europeo disponibles en bases de datos.

A diferencia de la elevada conservación de SGI-4, la estructura de la región RR de resistencia a antibióticos fue altamente variable (Figura 32). Sin embargo, en los 13 aislamientos caracterizados consistió en un único módulo, de acuerdo con lo previamente descrito para la RR de la cepa 07-02006 (García *et al.*, 2016). La heterogeneidad se debió a: i) la inserción en HUD 1/16 de un segmento adicional de 4.265 pb que contiene el gen *floR* de resistencia a cloranfenicol y florfenicol, antes del gen *strB*. El segmento adquirido está flanqueado por copias truncadas de ISVsa3, una IS perteneciente a la familia IS91; ii) la delección de los genes *strBA-sul2* en HUD 2/12; iii) la delección de los segmentos correspondientes a *bla*_{TEM-1B}, *strB-strA-sul2* en HUD 2/14 y LSP 323/17 y HUD 3/12; iv) la ausencia de los genes *mer* en los cuatro aislamientos anteriores; v) la presencia de los genes MAK, originalmente detectados en la RR de la cepa 07-02006, en todos los aislamientos excepto LSP 236/14 y 149/15; vi) la variación en el sitio de inserción de las distintas RR, que afecta principalmente al borde izquierdo pero también al derecho. Dicha variación se debe a las diferentes delecciones asociadas a la inserción de las RR, que siempre incluyeron los genes *fljA*, *fljB* y *hin*, responsables de la expresión de la flagelina de segunda fase.

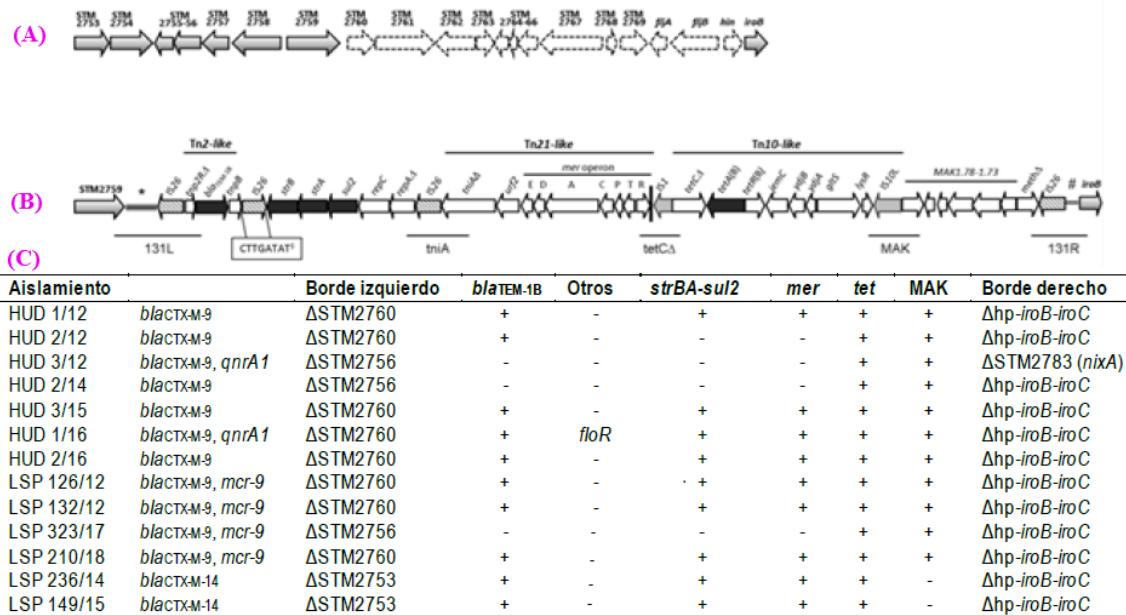


Figura 32. Estructura de la región RR de los aislamientos clínicos resistentes a cefotaxima. Las *orfs* se representan con flechas dispuestas en la orientación de transcripción. En gris se indican los genes de LT2 conservados en la cepa 07-02006; en blanco con líneas discontinuas, los genes localizados en la región delecionada; en negro, los genes implicados en resistencia. Los genes presentes en cada aislamiento se indican con un signo más (+).

- (A) Estructura de la región *fljAB-hin* en el genoma de LT2 (nº de acceso AE006468.1).
- (B) Estructura de la region RR de la cepa monofásica 07-02006 (Tomada de P. García, Tesis Doctoral).
- (C) Tabla resumen del contenido de las regiones RR de cada uno de los aislamientos clínicos analizados en este apartado.

4.1.3.3.5.4. Bases genéticas de la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro

Como se comentó anteriormente, la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro se debió a la presencia de los genes *bla*_{CTX-M-9.0} *bla*_{CTX-M-14}, localizados en plásmidos IncH12, con tamaños comprendidos entre 250 y 350 Kb o en plásmidos IncI1 (de 97 Kb aproximadamente), respectivamente (Tabla 29). El gen *bla*_{CTX-M-9} se encuentra en integrones complejos de clase 1 de tipo In60, con el *intI1* (que codifica el enzima integrasa) intacto o truncado por inserción de IS26. Estos integrones presentaron 2 configuraciones de casetes génicas en su VR: i) *dfrA16-aadA2b* fue la más común, apareciendo en 10 aislamientos; ii) *ant-(2'')-Ia (aadB)-aadA2b*, presente en 2 aislamientos. En todos los casos, a continuación del 3'-CS, portador de los genes *qacEΔ1-sul1*, se detectó la secuencia de inserción ISCR1 situada por delante del gen *bla*_{CTX-M-9}. Coincidiendo con integrones de tipo In60 previamente descritos, a continuación de *bla*_{CTX-M-9}, se encontraron *ofr3* e IS3000 (truncada por IS1), pero no secuencias derivadas de Tn402. Cabe destacar, además, que en los plásmidos IncH12 de 2 aislamientos se detectó el gen *qnrA1* de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas y que en los plásmidos IncH12 de todos los

aislamientos del PA, tanto del HUCA como del HUC, se localizó el gen *mcr-9* que, a diferencia de otros genes *mcr*, no confiere resistencia a colistina en *S. enterica*.

Como se comentó anteriormente, *bla*_{CTX-M-14}, detectado en 2 aislamientos del PA se localizó en plásmidos IncII. En ambos, el gen se localizó en un contig de pequeño tamaño (3 Kb, aproximadamente), situado entre las secuencias de inserción IS10 e IS903. Sin embargo, *ISEcp1*, que con frecuencia se encuentra en el entorno de genes *bla*_{CTX-M} y que parece haber contribuido de forma importante a su dispersión, no está presente. El entorno de los genes *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-9} se muestra en las Figuras 33A y 33B, respectivamente.

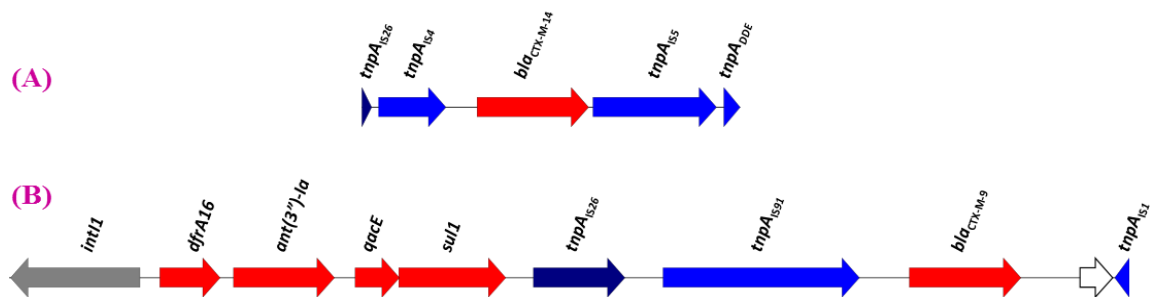


Figura 33. Entornos de los genes *bla*_{CTX-M-14} y *bla*_{CTX-M-9}. Figura creada con easyfig BLASTn a partir de las secuencias de los n°s de acceso JAICCV000000000 y JAICCT000000000, respectivamente. En azul oscuro se indica la *trpA* de IS26; en azul, las *trpA* de otras IS; en rojo, los genes de resistencia; en gris, otras funciones; y en blanco, otros genes de función desconocida.

(A) Entorno del gen *bla*_{CTX-M-14}.

(B) Entorno del gen *bla*_{CTX-M-9}.

4.1.3.3.6. Neumonía nosocomial causada por el clon monofásico europeo en un paciente inmunocompetente

En esta tesis doctoral también se investigó un caso excepcional de neumonía, originada a consecuencia de la infección por *S. enterica* de un paciente inmunocompetente ingresado en la UCI del HUCA. Además de la singularidad del caso, destaca la aparición post-tratamiento de resistencia a fluoroquinolonas, amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam por parte de la bacteria implicada. El estudio se dividió en dos apartados: descripción del caso y caracterización de la bacteria responsable, utilizando para ello técnicas experimentales y secuenciación genómica.

4.1.3.3.6.1. Descripción del caso

En junio de 2020, un hombre de 71 años ingresó en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del HUCA, por bajo nivel de conciencia, afasia y episodios convulsivos. Una tomografía computarizada reveló un hematoma subdural, hemorragia subaracnoidea y otros hematomas en los lóbulos frontal y occipital de origen traumático, lo que también resultó en la fractura de dos costillas derechas. Se desconoce si el trauma ocurrió antes o durante de un episodio convulsivo. Al ingreso, el paciente presentó una leve recuperación permaneciendo en coma (con puntuación 13 puntos en la escala de Glasgow), sin ningún otro síntoma. Cuatro días después desarrolló insuficiencia respiratoria y fiebre con leucocitosis, niveles elevados de procalcitonina (46 ng/dl) e infiltrados en el lóbulo pulmonar inferior derecho visibles en radiografía de tórax. El paciente fue intubado y diagnosticado de neumonía nosocomial precoz según las guías internacionales, y se inició tratamiento antimicrobiano con amoxicilina/ácido clavulánico (Torres *et al.*, 2017). A partir de un hemocultivo del paciente, incubado en un BacT/ALERT® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), disponible en el hospital, y también de un aspirado traqueal, se recuperaron bacilos Gram negativos. Veinticuatro horas después, se observó un empeoramiento de los parámetros, así como anomalías de la función hepática, observándose colestasis en las pruebas bioquímicas de sangre. El paciente evolucionó a shock séptico y el tratamiento fue cambiado por meropenem. Se realizó un escáner abdominal sin otros hallazgos patológicos aparte de colelitiasis.

Los bacilos Gram negativos recuperados tanto del hemocultivo como del aspirado traqueal fueron identificados como *S. enterica* mediante MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, BD, Bremen, Alemania). La determinación de la susceptibilidad/resistencia frente a antimicrobianos, reveló que las bacterias eran sensibles a todos los ensayos, excepto amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam y ciprofloxacina (Tabla 30), por lo que el tratamiento se desescaló a cefotaxima. Aunque el paciente no presentó diarrea, también se tomó una muestra de heces que resultó positiva para *S. enterica*.

El paciente presentó una evolución clínica favorable con mejora de todos parámetros analíticos excepto por anomalías de la función hepática, y un nuevo escáner abdominal mostró colecistitis aguda sin mayor complicación. Siguiendo las recomendaciones de los cirujanos, se aplicó un tratamiento conservador y el paciente se recuperó de la infección, clínica y analíticamente. Desafortunadamente, sus problemas neurológicos se agravaron, desarrollando un estado epiléptico no convulsivo. El paciente, que permaneció en estado vegetativo, fue dado de alta de la UCI a los 30 días y falleció 3 días después en la planta de neurocirugía.

Cuatro meses antes (en febrero de 2020) el paciente había sido ingresado en el área de nefrología del mismo hospital, con diagnóstico de gastroenteritis y fallo renal agudo. Por entonces, ya se había recuperado *S. enterica* tanto de heces como de sangre del paciente. Estos

aislamientos mostraron el mismo patrón de susceptibilidad que los recuperados posteriores, excepto que habían sido sensibles a quinolona / fluoroquinolona, amoxicilina- clavulánico y piperacilina- tazobactan (Tabla 30). En consecuencia, el paciente fue tratado inicialmente con cefotaxima, y después con ciprofloxacino por vía oral, tras el alta con completa recuperación.

4.1.3.3.6.2. Caracterización bacteriana

El aislamiento inicial recuperado en febrero de 2020 a partir de heces no se había conservado en el HUCA, por lo que no pudo ser incluido en el estudio. Los cuatro aislamientos restantes fueron analizados frente a un nuevo panel de antimicrobianos, lo cual puso de manifiesto la tetrarresistencia característica del clon europeo. Además, la secuenciación de los genomas y posterior análisis bioinformático, asignó los cuatro aislamientos al serotipo 4,12:i:- y a la secuencia tipo ST34, además de identificar los genes *bla*_{TEM-1B}, *strA*, *strB*, *sul2* y *tet(B)* como responsables del fenotipo tetrarresistente. Además, en los tres aislamientos recuperados en junio de 2020, que fueron resistentes a amoxicilina, clavulánico y piperacilina-tazobactam (Tabla 30) se detectó una mutación puntual en el gen cromosómico *gyrB* (TCT a TTC), que conduce a una sustitución del aminoácido S464F en la proteína. Las bases genéticas responsables de la resistencia a piperacilina-tazobactan no están claras, y se está investigando la sobreproducción del gen *bla*_{TEM-1B} como mecanismo responsable (transcripción mejorada de *bla*_{TEM-1} o copia aumentada número del gen; Hubbard *et al.*, 2020; Lartigue *et al.*, 2002).

Tabla 30. Características clínicas y microbiológicas de los aislamientos monofásicos (4: i :-) ST34 de *Salmonella enterica* recuperados en el HUCA de un paciente con neumonía.

Aislamiento ^a	Origen	Fecha de aislamiento	Fenotipo/ genotipo ^b Mutación en <i>gyrB</i> (cambio de aminoácido)	NAL/CIP CMI (µg/mL)	Pefloxacino ^c (mm)
HUCA_02174600	Sangre	24-02-2020	AMP, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	8/0,047	Negativo (24)
HUCA_020475219	Aspirado traqueal	28-06-2020	[AMP, AMX], PTZ, STR, SUL, TET, CIP/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> TCT to TTC (S464F)	24/0,19	Positivo (12)
HUCA_020475222	Sangre	28-06-2020	[AMP, AMX], PTZ, STR, SUL, TET, CIP/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> TCT to TTC (S464F)	24/0,25	Positivo (14)
HUCA_248014172	Heces	28-06-2020	[AMP, AMX], PTZ, STR, SUL, TET, CIP <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> TCT to TTC (S464F)	32/0,25	Positivo (14)

a, se recuperó un aislamiento al mismo tiempo que HUCA_02174600 con el mismo fenotipo de resistencia a partir de heces del paciente, pero no estuvo disponible para su análisis. HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias.

b, AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina-ácido clavulánico; CIP, ciprofloxacino; PTZ, piperacilina-tazobactam; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina.

c, La resistencia a perfloraxino (5µg) se realizó utilizando la técnica de difusión disco-placa siguiendo las recomendaciones EUCAST para el rastreo de resistencia clínica a fluoroquinolonas en *Salmonella*.

4.1.3.3.7. Relaciones filogenéticas existente entre los aislamientos del clon europeo

Finalmente, se evaluó la relación filogenética existente entre los aislamientos del clon europeo, incluyendo los procedentes de alimentos a fines comparativos (Figura 34; apartado 4.1.4.2). El análisis se basó en el número de SNPs, que varió desde cero (entre LSP 98/18 y LSP 112/98 y LSP 236/14 y LSP 149/15) hasta 147 (LSP 38/19 en relación a HUCA_020475222 y HUCA_248014712). Los aislamientos se distribuyeron en dos clados (A y B). el primero de ellos está compuesto únicamente por los aislamientos implicados en el caso de neumonía, siendo todos ellos positivos para *sopE*. El resto se agrupa en el segundo clado, que comprende varios sub-clados. Prácticamente todos los demás aislamientos portadores de *sopE* se sitúan en dos de ellos. Este gen se encontró en la mayoría de los aislamientos de origen clínico (73,1%, 19/26) pero solo en uno de los cuatro procedentes de alimentos.

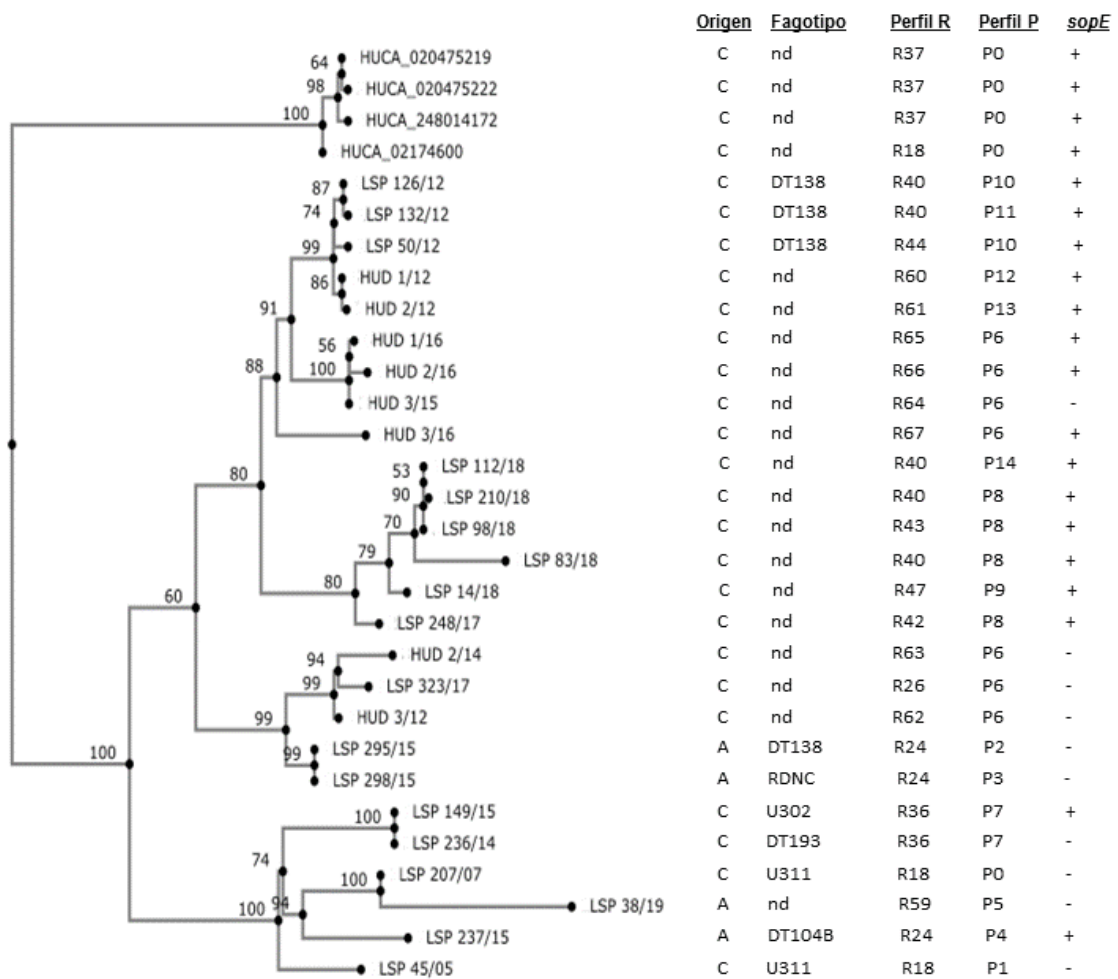


Figura 34. Árbol filogenético construido en base a los SNPs del genoma completo de los aislamientos del clon europeo analizados en este estudio utilizando como referencia la cepa LSP 207/07 (Anexo XV). Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 1000 réplicas.

4.1.4. Características generales de los aislamientos de alimentos obtenidos en el Principado de Asturias durante 2008-2018

Como se comentó anteriormente, durante este periodo se detectaron un total de 126 aislamientos procedentes de alimentos. Mediante serotipificación, llevada a cabo en el CNM, se asignaron a dos fórmulas antigénicas: 4,5,12:i:- (58,7%) y 4,12:i:- (41,2%), que revelan la ausencia de antígenos flagelares de segunda fase. Por otro lado, la fagotipificación de los 123 aislamientos anteriores a 2017, realizada en el CNM, permitió su asignación a DT138 (19,6%), RDNC (17,2%), DT195 (13,9%), U311 (11,5%), DT193 (6,6%), DT104B (5,8%), DT22 (4,1%), U302 (1,7%) y UT (19,6%). Todos los aislamientos de alimentos fueron resistentes a uno o más antibióticos y, en base a los fenotipos de resistencia, junto con los genes implicados y su localización (que se indicarán más adelante), fueron tentativamente asignados a diferentes clones.

4.1.4.1. Los clones español y sud-europeo

De los 126 aislamientos procedentes de alimentos recuperados en el PA durante el periodo 2008-2018, 5 y 2 aislamientos fueron asignados a los clones español y sud-europeo, respectivamente.

De los 5 aislamientos de clon español, 4 proceden de la misma muestra, en concreto superficie de canal, mientras que el otro se aisló de un derivado cármico (Tabla 31). En ambos casos, el animal de origen se desconoce. Los 5 aislamientos se asignaron al serotipo 4,5,12:i:- y al fagotipo U302 (el último) o fueron UT (los 4 primeros). Estos últimos presentaron el perfil de resistencia R14, que fue el mayoritario entre los aislamientos de origen clínico (Tabla 25). El quinto aislamiento mostró el perfil R6, diferente a todos los encontrados en los aislamientos clínicos (Tabla 31).

Tabla 31. Características generales de los aislamientos del clon español y sud-europeo procedentes de alimentos registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

Aislamiento ^a	Fagotipo ^b	Origen	Perfil R	Fenotipo/ Genotipo R ^c	Inc/ Perfil P ^d
Clon español					
LSP 87/13	UT	Superficie de canal	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ bla _{TEM-1B} , aac(3)-IV, [sul1, sul2], tet(A)	IncC/ P3
LSP 88/13	UT	Superficie de canal	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ bla _{TEM-1B} , aac(3)-IV, [sul1, sul2], tet(A)	IncC/ P3
LSP 89/13	UT	Superficie de canal	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ bla _{TEM-1B} , aac(3)-IV, [sul1, sul2], tet(A)	IncC/ P3
LSP 90/13	UT	Superficie de canal	R14	[AMP, AMX], [GEN, TOB], SUL, TET/ bla _{TEM-1B} , aac(3)-IV, [sul1, sul2], tet(A)	IncC/ P3
LSP 195/13	U302	Derivado cármico	R6	[AMP, AMX], CHL, STR, SUL, TET, TMP/ bla _{TEM-1B} , aac(3)-IV, [sul1, sul2], tet(A), dfrA12	IncC/ P6

(Continuación Tabla 31)

Clon sud-europeo					
LSP 355/15	RDNC	Picadillo de jabalí	R1	AMP, GEN, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , ni, [<i>strA</i> , <i>strB</i>], <i>su2</i> , <i>tet(B)</i>	IncR/ P1
LSP 356/15	RDNC	Picadillo de jabalí	R2	AMP, GEN, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{TEM-1B} , ni, [<i>strA</i> , <i>strB</i>], <i>su2</i> , <i>tet(B)</i>	IncR/ P1

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, UT, UnTypeable; RDNC, Reaction but Did Not Conform.

c, R, resistencia; AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina- clavulánico; GEN, gentamicina; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim; TOB, tobramicina.

d, Inc, grupo de incompatibilidad; P, perfil plasmídico.

A continuación, se seleccionaron dos de estos aislamientos para su secuenciación: LSP 87/13, como representante de la primera muestra, y LSP 195/13, procedente de la segunda. La secuenciación permitió identificar *in silico* genes de resistencia a metales pesados y desinfectantes (Tabla 32), encontrándose en ambos copias intactas de los *loci merRTPCADE* y *silEFSRCBAGP*, que confieren resistencia a mercurio y plata/cobre respectivamente, así como los genes *arsH* y *arsR2* de resistencia a organoarsenicales. Además, en ambos aislamientos se detectó el gen *qacEA1* que confiere resistencia a compuestos derivados del amonio cuaternario.

Tabla 32. Genes de resistencia a metales pesados y antisépticos identificados en los aislamientos del clon español procedentes de alimentos del Principado de Asturias en el periodo 2008-2018.

	MER						SIL						ARS		QAC					
	<i>merR</i>	<i>merT</i>	<i>merP</i>	<i>merC</i>	<i>merA</i>	<i>merD</i>	<i>merE</i>	<i>silE</i>	<i>silF</i>	<i>silS</i>	<i>silR</i>	<i>silC</i>	<i>silB</i>	<i>silA</i>	<i>silG</i>	<i>silP</i>	<i>arsH</i>	<i>arsR2</i>	<i>qacEA1</i>	<i>qacH</i>
LSP 87/13																				
LSP 195/15																				

MER, mercurio; SIL, plata; ARS, arsénico; COP, cobre; QAC, derivados del amonio cuaternario.

En cuanto al perfil plasmídico (Tabla 33), ambos aislamientos presentaron un plásmido grande de gran tamaño pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncC (de 140 y 170 Kb, para LSP 87/13 y LSP 195/13, respectivamente), portador de una relaxasa de tipo traI/MOBH-T4SS y con secuencia tipo ST10*, al igual que los aislamientos de origen clínico. El plásmido de LSP 195/13 contiene una copia intacta del locus *spvABCDR* de pSLT, mientras que en el de LSP 87/13 se encuentra deletado (*spvAR*). Además, se constató la presencia de plásmidos crípticos de pequeño tamaño (entre 10,8 y 2 Kb) pertenecientes a los grupos de incompatibilidad ColE, Col(BS512) o de replicón no identificado. El perfil plasmídico se determinó teniendo en cuenta los criterios y los perfiles establecidos para los aislamientos de origen clínico, asignándose a P2 (LSP 87/13) y P6 (LSP 195/15), ambos identificados previamente.

Tabla 33. Contenido plasmídico de los aislamientos monofásicos del clon español procedentes de alimentos recuperados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

Aislamiento ^a	Perfil P ^b	Tamaño de plásmido (Kb)	Contigs ^c	Inc ^d	Relaxasa ^e	Proteína de replicación ^f
LSP 87/13	P2	143.632	22	IncC	traI-MOBH-T4SS	Rpt-A5
		4.073	1*	nd	ni	ni
		2.101	1*	Col(BS512)	ni	ni
		1.88	1*	oriColE	ni	ni
LSP 195/15	P6	167.347	24	IncC	traI-MOBH-T4SS	Rpt-A5
		10.873	5	nd	MOBP1-T4SS	ni
		2.101	1*	Col(BS512)	Ni	ni

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, P, perfil plasmídico.

c, Se indican con asterisco los plásmidos circularizados (*).

d, nd, no detectado.

e,f,g, ni, no identificado.

En cuanto al contenido en genes y elementos genéticos implicados en virulencia, los dos aislamientos presentaron el mismo perfil que los clínicos en cuanto a SPIs (14, incluidas SPI-1 a 6, SPI-9 a 14, SPI-16 y SPI-24), genes implicados en la biosíntesis de flagelos y fimbrias, así como otros genes de virulencia de localización cromosómica y/o plasmídica, a excepción del locus *spv* ya mencionado. En cuanto a las bases genéticas del fenotipo monofásico, ambos aislamientos presentaron una delección más frecuente en los de origen clínico, de tipo $\Delta fljAB-I$. Por otro lado, aunque el contenido en profagos de los dos aislamientos de alimentos fue diferente (perfiles PH38 y PH39), se observa una alta similitud entre ambos y respecto a los aislamientos de origen clínico (Tabla 34). Además, el contenido en genes de virulencia asociados a profagos fue idéntico al mostrados por los aislamientos de origen clínico.

Tabla 34. Contenido en profagos y perfil de los aislamientos monofásicos del clon español procedentes de alimentos del Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

	Glsy 1	Glsy 2	sal3	ST104	SJ46	Escher_500465	cronob_ESSL_2	SN	sIV	Edward_GF_2	RCS47	phIE255	Fels 1	Profagos totales	Perfil PH
LSP 87/13	c	c	c/i	c		i/q	q	i	i	c	i	i	q	14	PH38
LSP 195/13	c	c	c/i	c	i	i/i	q	i	i	c		i	q	15	PH39

c, profago completo; i, profago incompleto; q, profago cuestionable; PH, perfil de profagos PHASTER.

Finalmente, el análisis filogenético mostró que estos aislamientos se encuentran estrechamente relacionados con los de origen clínico (Figura 23). Uno de ellos se situó en el clado A (LSP 195/13), mientras que el otro formó parte del B (LSP 87/13), diferenciándose en un total de 61 SNPs. El número mínimo y máximo de SNPs detectados respecto a los aislamientos de origen clínico fueron 34 (entre LSP 195/13 y LSP 389/97) y 88 (entre LSP 87/13 y LSP 148/18).

Los dos aislamientos pertenecientes al clon sud-europeo, con serotipo 4,5,12:i- y fagotipo RDNC, se obtuvieron de la misma muestra, en concreto picadillo de jabalí (Tabla 31). Ambos aislamientos presentaron el mismo perfil de resistencia a antibióticos, que difiere de los encontrados en los aislamientos clínicos al incluir resistencia frente a gentamicina, no descrita en este clon. Sin embargo, el gen responsable de esta resistencia no pudo ser identificado experimentalmente, y estos aislamientos aún no han sido secuenciados. Ambos aislamientos presentaron el perfil plasmídico P1 (siguiendo la numeración establecida para los de origen clínico (Tabla 23). que incluye un único plásmido del grupo de incompatibilidad IncR.

4.1.4.2. El clon europeo

Como se mencionó anteriormente, de los 126 aislamientos de origen alimentario, todos excepto 7, fueron asignados al clon europeo en base al perfil de resistencia mostrado y la ausencia de replicones IncC e IncR. Además, en este apartado, junto con los del periodo 2008-2019, se caracterizó un aislamiento de 2019 seleccionado por presentar resistencia a colistina y cefotaxima.

4.1.4.2.1. Asignación al clon

La combinación de fenotipo/genotipo de resistencia (Tabla 35) indicó que 119 de los 126 aislamientos monofásicos procedentes de alimentos del periodo 2008-2014 (94,4%) y el aislamiento de 2019 podrían pertenecer al clon europeo. Estos aislamientos se asignaron a 21 perfiles de resistencia. 13 de ellos fueron idénticos a los encontrados en los aislamientos de origen clínico (comprendidos entre R1 y R51), mientras que los restantes son diferentes (R52 a R59). Al igual que en los aislamientos clínicos, el perfil mayoritario fue R18, compartido por 77 aislamientos (60,6%), que se corresponde con la tetrarresistencia característica del clon. Los perfiles restantes derivan del mayoritario por pérdida de una, dos o tres resistencias, por ganancia de resistencias adicionales o por pérdida y ganancia de resistencias.

En cuanto a las resistencias adicionales, destaca la adquisición de nuevos genes que codifican resistencia frente a antimicrobianos clásicos, como aminoglicósidos [*aadA1*, *aadA2*, *aac(3)-IV*, *aph(3')-Ia* y *aph(4)-Ia*], cloranfenicol (*cmlA1* y *floR*), tetraciclina [*tet(A)* y *tetM*], sulfonamidas [*sul3*] y trimetoprim (*dfrA12*). Sin embargo, de particular relevancia es la adquisición de genes de resistencia a antibióticos de última línea, como las cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas (*bla_{CMY-2}*) o de último recurso, como la colistina (*mcr-1.1*). La presencia de estos genes, que aparecen en múltiples combinaciones junto con los asociados a la tetrarresistencia, explican los fenotipos de resistencia determinados experimentalmente. Dichos

genes fueron detectados experimentalmente mediante amplificación por PCR, y, en algunos casos, mediante análisis bioinformático de los genomas secuenciados (ver apartado 4.1.4.2.4).

Tabla 35. Perfiles de resistencia (fenotipo y genes responsables) de aislamientos del clon monofásico europeo procedentes de alimentos del Principado de Asturias.

Perfil R	Fenotipo R ^a	Genes R ^b	N ^c
R1	AMP	<i>bla</i> _{TEM-1B}	4
R2	STR	<i>strAB</i>	1
R4	TET	<i>tet(B)</i>	11
R6	AMP, SUL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i>	1
R7	AMP, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>tet(B)</i>	6
R8	STR, TET	<i>strAB</i> , <i>tet(B)</i>	1
R9	SUL, TET	<i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	1
R11	AMP, STR, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>tet(B)</i>	1
R12	AMP, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	1
R18	AMP, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	77
R21	[AMP, AMX], STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	1
R24	AMP, STR, SUL, TET, COL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>mcr-1</i>	4
R27	AMP, CHL, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	2
R52	STR, SUL	<i>strAB</i> , <i>sul2</i>	1
R53	AMP, GEN, STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	1
R54	AMP, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>dfrA12</i>	2
R55	AMP, CHL, STR, SUL, TET, TMP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>cmIA1</i> , [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>], <i>sul2</i> , [<i>tet(B)</i> , <i>tetM</i>], <i>dfrA12</i>	1
R56	[AMP, AMX], STR, SUL, TET, CIP	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i> , <i>ni</i>	4
R57	[AMP, AMX], [GEN, TOB], STR, SUL, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(3)-IV</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	1
R58	[AMP, AMX], CHL, GEN, STR, TET	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>floR</i> , <i>ni</i> , <i>strAB</i> , <i>tet(B)</i>	5
R59	AMP, [CTX, FOX], CHL, [GEN, KAN, TOB], STR, SUL, TET, TMP, COL	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-2} , [<i>cmIA1</i> , <i>floR</i>], [<i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(3)-Ia</i> , <i>aph(4)Ia</i>], [<i>strAB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i>], [<i>sul2</i> , <i>sul3</i>], [<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tetM</i>], <i>dfrA12</i> , <i>mcr-1</i>	1

a, R, resistencia; Los 13 primeros perfiles (R1-R27) fueron compartidos con los aislamientos clínicos de este clon.

b, AMP, ampicilina; AMX, amoxicilina- clavulánico; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacino; CTX, cefotaxima; COL, colistina; FOX, ceftioxitina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim; TOB, tobra micina.

c, N, n° de aislamientos que comparten dicho perfil.

4.1.4.2.2. Determinación del serotipo, fagotipo y secuencia tipo

Los aislamientos del periodo 2008-2018 fueron asignados experimentalmente a los serotipos 4,5,12:i:- (58,7%) y 4,12:i:- (41,3%), mientras que el aislamiento de 2019 presentó la fórmula antigénica 4,5,12:i:-. El fagotipo fue determinado para los 119 aislamientos anteriores a 2017, que se adscribieron a DT138 (20,2%), RNDC (16%), DT195 (14,3%), U311 (11,8%), DT193 (6,7%), DT104B (5,9%), DT22 (4,2%) y U302 (0,8%), mientras que el 20,1% restante

fueron UT. La secuencia tipo solo se determinó mediante análisis *in silico*, para cuatro aislamientos resistentes a colistina cuyo genoma fue secuenciado (ver apartado 4.1.4.2.4).

4.1.4.2.3. Análisis plasmídico

De manera experimental se detectó la presencia de uno o más plásmidos de diferentes tamaños en 84 de aislamientos, identificándose los replicones IncHI2, IncX4, IncII e IncHI1 en 6, 4, 3, y 1 aislamientos, respectivamente. En otros 6 el grupo de incompatibilidad no se pudo determinar y tampoco se tipificaron plásmidos de pequeño tamaño (menor de 10 Kb), detectados solos o en combinación con otro(s) de mayor tamaño en numerosos aislamientos. En ningún de ellos se encontró el replicón IncFII, característico de pSLT, ni tampoco plásmidos de los grupos IncC e IncR, asociados a los clones español y sud-europeo, respectivamente.

4.1.4.2.4. Aislamientos ST34 resistentes a colistina

4.1.4.2.4.1. Origen y caracterización general de los aislamientos

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se caracterizaron 4 aislamientos del PA pertenecientes al clon monofásico europeo resistentes a colistina (Tabla 36). Estos aislamientos proceden de carne picada mixta de cerdo y temera, procesada para consumo en crudo (LSP 237/15), carne picada mixta (LSP 295/15 y LSP 298/15, ambos obtenidos de la misma muestra) y longaniza fresca (LSP 38/19). La resistencia a colistina fue inicialmente detectada en el LSP, mediante determinación de la CMI con Sensititre.

De acuerdo con la información aportada por el CNM a través del LSP, tres aislamientos (LSP 295/15, LSP 298/15 y LSP 38/19) presentaron el serotipo 4,5,12:i:- y uno de ellos el serotipo 4,12:i:- (LSP 237/15), al carecer del antígeno somático 5. LSP 237/15, LSP 295/15 y LSP 298/15 se asignaron a los fagotipos DT104B, PNR y DT138, respectivamente, mientras que el fagotipo de LSP 38/19 no fue determinado. La tipificación experimental mediante macrorrestricción-PFGE utilizando XbaI, identificó un patrón diferente para cada aislamiento (Figura 35). Sin embargo, los correspondientes a los aislamientos obtenidos la misma muestra (LSP 295/15 y LSP 298/15) son muy similares, como se observa visualmente y queda reflejado en el dendograma de similitud incluido en la Figura. Finalmente, mediante MLST llevado a cabo *in silico*, los cuatro aislamientos se asignaron a ST34, característica del clon monofásico europeo.

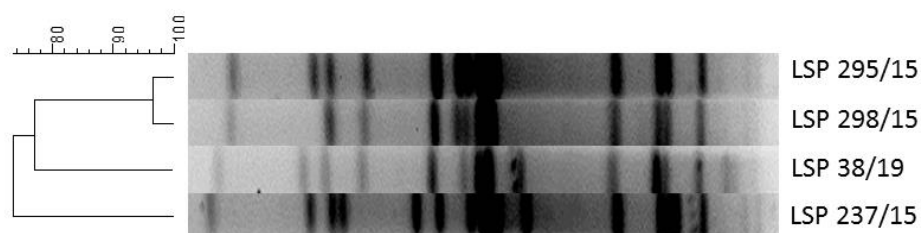


Figura 35. Perfiles de macrorestricción PFGE-XbaI identificados en los aislamientos del clon europeo resistentes a colistina y dendrograma de similitud donde se muestra la relación entre ellos.

En cuanto al estudio de resistencia a antibióticos, en primer lugar se determinó con mayor precisión la CMI de la colistina, utilizando el método de microdilución en medio líquido recomendado por EUCAST. Los valores obtenidos fueron de 16 $\mu\text{g/ml}$ (LSP 237/15) o de 8 $\mu\text{g/ml}$ (LSP 295/15, LSP 298/15 y LSP 38/19). En ningún aislamiento se detectaron mutaciones en los genes reguladores *pmrA/B*, de localización cromosómica, que confieren resistencia a colistina mediante la alteración de la expresión de enzimas implicadas en la modificación del LPS. Sin embargo, todos ellos fueron positivos para el gen *mcr-1.1*, de resistencia plasmídica a colistina. Además, los cuatro aislamientos compartieron la tetraresistencia típica del clon europeo, codificada por los genes *bla_{TEM-1B}*, *strA*, *strB*, *sul2* y *tet(B)* de localización cromosómica. LSP 38/19 presentó resistencias adicionales a otros muchos antibióticos, detectándose los genes *bla_{CMY-2}* (que codifica una β -lactamasa de tipo AmpC que confiere resistencia a cefotaxima y cefoxitina), *cmlA1* y *floR* (cloranfenicol), *aadA1*, *aadA2b*, *aac(3'')-IId*, *aph(3)-IV*, *aph(3')-Ia* y *aph(4)-Ia* (aminoglicósidos, como estreptomycin, gentamicina, kanamicina y tobramicina), *sul3* (sulfonamidas), *tet(A)* y *tetM* (tetraciclinas) y *dfrA12* (trimetoprim). Los perfiles de resistencia de estos aislamientos procedentes de alimentos coinciden con los perfiles R24 (LSP 237/15, LSP 295/15 y LSP 298/15) y R59 (LSP 38/19), previamente detectados en los aislamientos clínicos del clon monofásico europeo (Tabla 25).

En cuanto a perfil plasmídico, cada aislamiento, incluso los obtenidos de la misma muestra, mostró un perfil diferente, que incluyó al menos un plásmido de gran tamaño, junto con un número variable (entre uno y seis) de plásmidos de pequeño tamaño (Figura 36; Tabla 36). En los tres aislamientos del 2015, el gen *mcr-1.1* se localizó en plásmidos IncX4 con relaxasa de tipo MOBP3, de aproximadamente 33,3 Kb, mientras que en el único aislamiento del 2019, este gen se encontró en un plásmido IncH12, de 240 Kb con relaxasa de tipo MOBH. El gen *bla_{CMY-2}* de este último aislamiento se localizó en un plásmido IncII-I (α) con relaxasa *mckB/MOBP1-T4SS*, que fue asignado a ST2 por pMLST. En este aislamiento, los genes *aadA1*, *aadA2*, *aac(3'')-IId*, *cmlA1*, *floR*, *dfrA12* y *tetM* se localizaron, junto con *mcr-1.1*, en el plásmido IncH12; los genes *aadA1*, *cmlA1*, *sul3*, *tet(A)* y un locus *mer* incompleto (*merRTPC*), en un plásmido IncFIB-IncFIC con relaxasa de tipo *traI/MOBH* y el gen *aph(3')-Ia* en un plásmido ColE1 de pequeño tamaño. Por el momento, no fue posible establecer la ubicación de dos genes

RESULTADOS

adicionales de resistencia a aminoglicósidos, *aph(4)-Ia* y *aph(3)-IV*, que aparecen juntos, flanqueados por dos copias de IS26.

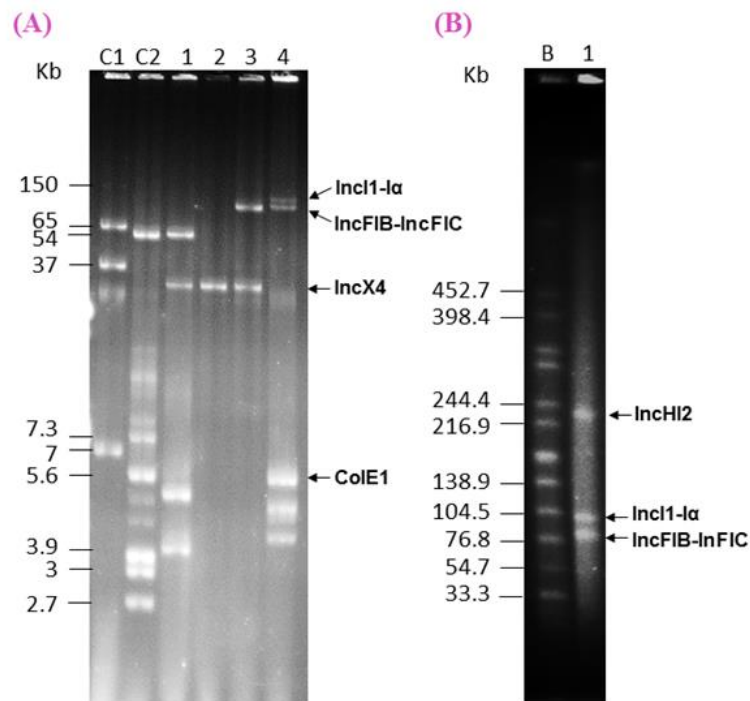


Figura 36. Análisis plasmídico de los aislamientos de origen alimentario pertenecientes al clon monofásico europeo. Los plásmidos de resistencia se indican en ambas figuras.

(A) Perfiles de plásmidos generados con el método Kado-Liu. C1 y C2, plásmidos obtenidos de *E. coli* 39R861 (NCTC 50192) y V517 (NCTC 50193) utilizados como patrones de tamaño para ADN no digerido; 1, LSP 237/15; 2, LSP 295/15; 3, LSP 298/15; 4, LSP 38/19.

(B) S1-PFGE. B, ADN de *Salmonella enterica* serotipo Braenderup H9812 digerido con XbaI usado como patrón de tamaño; 1, LSP 38/19.

Tabla 36. Origen y propiedades de aislamientos ST34 resistentes a colistina de origen alimentario de la variante monofásica de *Typhimurium. enterica*.

Aislamiento ^a	Origen	Fórmula antigénica	Fagotipo ^b	CMI colistina (µg/ml)	Fenotipo de resistencia ^c	Plásmidos (tamaño en pb) ^d
LSP 237/15	Carne de cerdo y temera procesada para su consumo en crudo	4,12:i:-	PT 104B	16	COL, AMP, STR, SUL, TET <i>mcr-1.1</i> , <i>blaTEM-1</i> , [<i>strA</i> , <i>strB</i>], <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	Incl2(β) (61,356) IncX4 (33,336)* ColE1-like (5,055)* ColE1-like (3,351)* IncX4 (33,304)*
LSP 295/15	Carne picada	4,5,12:i:-	PT 138	8	COL, AMP, STR, SUL, TET <i>mcr-1.1</i> , <i>blaTEM-1</i> , [<i>strA</i> , <i>strB</i>], <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	IncX4 (33,304)*
LSP 298/15	Carne picada	4,5,12:i:-	RNDC	8	COL, AMP, STR, SUL, TET <i>mcr-1.1</i> , <i>blaTEM-1</i> , [<i>strA</i> , <i>strB</i>], <i>sul2</i> , <i>tet(B)</i>	Incl1-(α)-ST _{unk} (88,771) IncX4 (33,304)*
LSP 38/19	Longaniza fresca	4,5,12:i:-	ND	8	COL, AMP, [CTX, FOX], CHL, [STR, GEN, TOB, KAN], SUL, TET, TMP <i>mcr-1.1</i> , <i>blaTEM-1</i> , <i>blaCMY-2</i> , [<i>cmiA1</i> , <i>florR</i>], [<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(3)-Ia</i> , <i>aph(4)-Ia</i>], <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , [<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tetM</i>], <i>dfrA12</i>	IncH12 (242,363) Incl1-(α)-ST2 (105,151) IncFIB , IncFIC-F46-A-B20 (84,823) ColE1 (5,699)* ColE1 (4,664)* UNK (3,751)*

^a, LSP, Laboratorio de Salud Pública. (Principado de Asturias). LSP 295/15 y LSP 298/15 pertenecen a la misma muestra.

^b, PT, fagotipo; RNDC, Reaction but Did Not Conform; ND, no determinado.

^c, COL, colistina; AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; FOX, cefoxitina; CHL, cloranfenicol; STR, estreptomicina; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; KAN, kanamicina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclinas; TMP, trimetoprim. La Resistencia a higromicina, codificada por el gen *aph(4)-Ia* no fue comprobada experimentalmente. Los antibióticos pertenecientes a la misma familia, así como los genes que confieren Resistencia a la misma familia de antimicrobianos se agrupan entre corchetes.

^d, Inc, grupo de incompatibilidad plasmídico; UNK, desconocido; IncX conjugativo (*mcr-1.1*), IncH12 (*mcr-1.1*) y otros genes de resistencia e Incl1-(α) (*blaCMY-2*), así como otros dos plásmidos de resistencia, IncFIB, IncFIC y ColE1, se resaltan en negrita (ver detalles en el texto). Los plásmidos cerrados se indican con asterisco.

4.1.4.2.4.2. Caracterización del entorno genético y estudio de la transferencia de los genes *mcr-1.1* y *bla*_{CMY-2}

Como se comentó anteriormente, el gen *mcr-1.1* se localizó en plásmidos IncX4 de 33,3 Kb en los aislamientos de 2015 y en un plásmido de IncHI2 de 242,4 Kb en el aislamiento de 2019 (Tabla 36). El entorno genético del gen *mcr-1.1* en los plásmidos IncX4 se muestra en la Figura 37A. Los plásmidos IncX4 de LSP 295/15 y LSP 298/15 fueron idénticos entre sí y se diferencian del plásmido IncX4 de LSP 237/15 por un único SNP y una inserción de 32 pb presente en este último. Estos plásmidos se encuentran también estrechamente relacionados (más del 99% de identidad y cobertura) con otros plásmidos IncX4 portadores del gen *mcr-1* secuenciados previamente (como pCFS3273-1 de *E. coli*; nº de acceso KX772777) o *mcr-1.2* (como pMCR1.2-IT de *Klebsiella pneumoniae*; nº de acceso KX236309). En todos ellos, el gen *mcr-1.1* se encontró adyacente a una *orf*, denominada *pap2*, que codifica una proteína transmembrana de la superfamilia PAP2. Sin embargo, cabe destacar la ausencia de la secuencia de inserción IS*ApII*, que estuvo probablemente involucrada en la movilización inicial del gen *mcr-1*, como parte del transposón compuesto *Tn6330* (Li *et al.*, 2017), así como la presencia, hacia el extremo 3' de *mcr-1.1*, de una copia de IS26 flanqueada por DRs de 8 pb (CTGTGTGA).

El gen *mcr-1.1* presente en el aislamiento de 2019 se localizó en un contig de 83 Kb (Figura 37A) perteneciente al plásmido IncHI2. Al igual que en los plásmidos IncX4, este gen se encuentra adyacente a *pap2* sin presencia de IS*ApII*. Los genes *mcr-1.1-pap2*, se localizaron entre dos *orfs* que codifican proteínas hipotéticas, al igual que se observa en el plásmido de un aislamiento de *Salmonella* (S15BD05371) que de acuerdo con SeqSero y MLST pertenece a la variante monofásica ST34 de Typhimurium (nº de acceso GCF_014857405 .1). El contig de 83 Kb presenta una elevada similitud con secuencias de otros plásmidos IncHI2 que o bien carecen de *mcr-1.1* (por ejemplo pKURS18, nº de acceso KM396298) o contienen el gen en una región diferente (pSE98-00436, nº de acceso NZ_CP020493). Finalmente, el gen *bla*_{CMY-2} de LSP 38/19 se localizó en un contig de 35,6 Kb perteneciente al plásmido IncII-*I* α (Tabla 36), formando parte de la estructura ISS*bol-like*- Δ ISE*cp1*-*bla*_{CMY-2}-*blc-sugE* próxima al gen *repZ* (Figura 37B). Este contig se encuentra estrechamente relacionado con regiones de plásmidos IncII-*I* α -ST2 identificados en aislamientos de *E. coli* de un paciente humano (pC-6; nº de acceso KT186369) y un perro (pR7AC; nº de acceso KF434766).

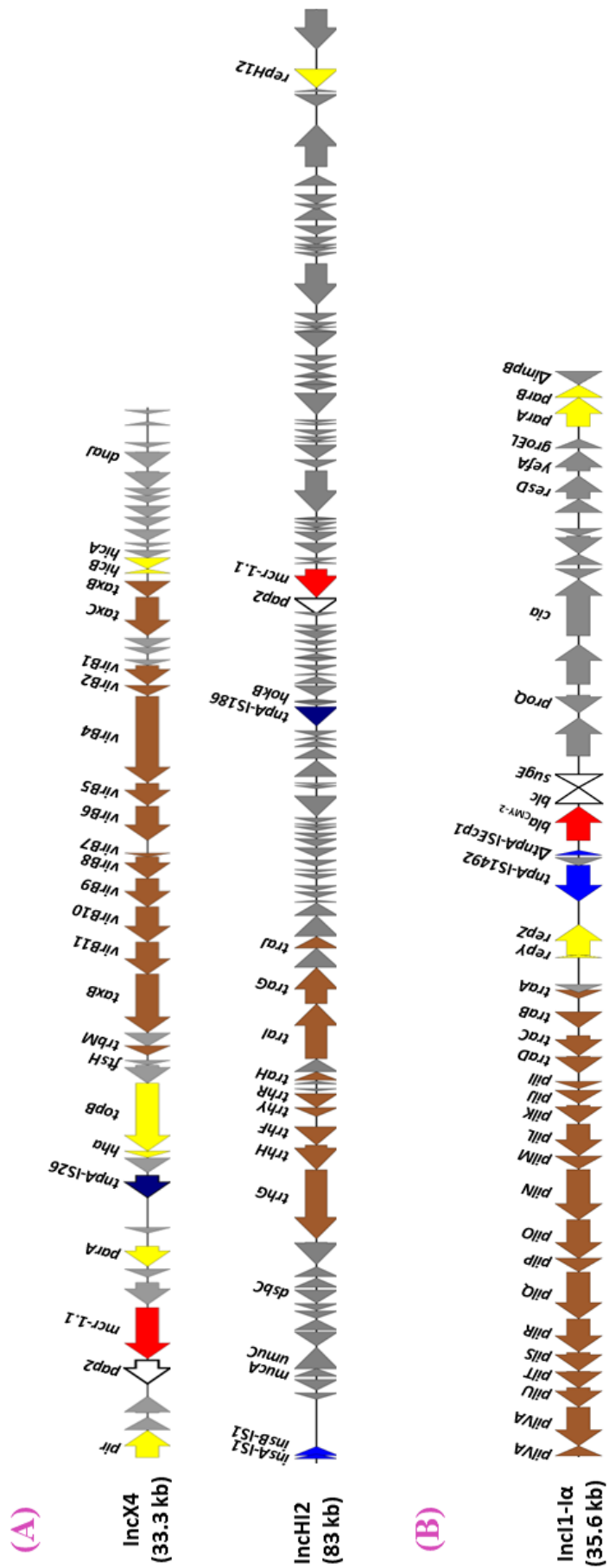


Figura 37. Entorno genético de los genes *mcr-1.1* y *blaCMY-2* detectados en los aislamientos procedentes de alimentos del clon monofásico europeo. Las *orf*s se representan por flechas que apuntan en la dirección de la transcripción y tienen diferentes colores en base a su función: rojo, resistencia; amarillo, replicación, estabilidad y mantenimiento de plásmidos; marrón, conjugación; azul, movilidad del ADN, con el gen *trpA* de IS26 resaltado en azul oscuro; gris, otras funciones; blanco, *pap2*, adyacente al gen *mcr-1.1* en los plásmidos IncX4 e IncHI2, y *bcl-sugE*, adyacentes a *blaCMY-2* localizados en el plásmido IncI1- α). La escala es diferente para A, B y C. Los tamaños en Kb corresponden a todos los plásmidos IncX4 y a los contigs pertenecientes al plásmido IncHI2 de 242.4 Kb y el plásmido IncI1- α de 105.2 Kb, donde se localizaron los genes *mcr-1.1* y *blaCMY-2*, respectivamente.

(A) Entorno genético de *mcr-1.1* localizado en plásmidos IncX4 (LSP 237/15, LSP 295/15 y LSP 298/15) e IncHI2 (LSP 38/19).

(B) Entorno genético del gen *blaCMY-2* localizado en un plásmido IncI1- α (LSP 38/19).

RESULTADOS

Finalmente, se comprobó experimentalmente que los plásmidos IncX4, IncHI2 e IncII-I(α) pueden transferirse a *E. coli* por conjugación/mobilización con las frecuencias mostradas en la Tabla 37.

Tabla 37. Frecuencias de conjugación / movilización de los plásmidos IncX4, IncHI2 e IncII-I(α) de cepas resistentes a la colistina transmitidas por alimentos de la variante monofásica ST34 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium

Cepa donadora / Plásmido(s)	Selección para:	Selección con ^a :	Frecuencia de transferencia ^b (error estándar)	
			28°C	37°C
LSP 237/15 / IncX4; IncII2(δ) ^c	IncX4	RIF + COL	nd ^d	1.5 x 10⁻⁶ (0.98)
LSP 295/15 / IncX4	IncX4	RIF + COL	nd	2.6 x 10⁻⁶ (0.85)
LSP 298/15 / IncX4; IncII1-I(α) ^c	IncX4	RIF + COL	nd	0.6 x 10⁻⁶ (0.42)
LSP 38/19 / IncHI2; IncII1-I(α)	IncHI2	RIF + COL	2.6 x 10⁻⁵ (1.2)	1.6 x 10⁻⁵ (1.2)
LSP 38/19 / IncHI2; IncII1-I(α)	IncII1-I(α)	RIF + CTX	<1.9 x 10⁻⁸	3.6 x 10⁻⁵ (1.8)

a, RIF, rifampicina; COL, colistina; CTX, cefotaxima.

b, Las frecuencias de conjugación (mostradas en negrita) representan el número de transconjugantes por célula donadora y resultan del promedio de tres experimentos independientes.

c, Plásmidos crípticos cuya selección no está disponible.

d, nd: no detectado

Como se observa en la Figura 38, las regiones de tetrarresistencia de LSP 295/15 y LSP 298/15 son idénticas entre sí y consisten en un módulo contiguo idéntico al de la cepa 07-2006, descrito previamente por García *et al.* (2016). Sin embargo, el ADN flanqueante en los bordes izquierdo y derecho es diferente (Δ STM2756 y un segmento invertido de aproximadamente 5,3 Kb que abarca desde Δ STM2816 a *iroB* y flanqueado por copias orientadas de manera opuesta de IS26, en el caso de LSP 295/15 y LSP 298 / 15, y STM2759 e *iroB* en la cepa 07-2006). Por el contrario, las regiones de tetrarresistencia de LSP 237/15 y LSP 38/19 comprenden dos módulos insertados entre Δ STM2753 e *iroB*. Los módulos de LSP 38/19 se parecen a los de 105/7/03 (Lucarelli *et al.*, 2012), excepto por el locus *mer* que está presente en el último, pero no en el primero. En ambos casos, Δ STM2759 a Δ STM2753, invertidos con respecto a su orientación en el cromosoma de Typhimurium LT2, se encuentran entre los dos módulos. La organización de LSP 237/15 es similar a la de LSP 38/19, excepto que el primer módulo y las *orfs* adyacentes (Δ STM2759 a Δ STM2753) están invertidas en LSP 237/15, y, además, entre ambos módulos se encuentran *orfs* adicionales (Δ STM2759 a Δ STM2761, precedidos por un elemento IS26). En todas las cepas, excepto 105/7/03, la evolución de la región de tetrarresistencia se asocia con deleciones de varias *orfs* cromosómicas que en todos los casos incluye los genes *fljAB*, así como la totalidad (LSP 295/15, LSP 298/15, LSP 38/19 y 07-2006) o parte (LSP 237/15) del gen *hin*, siendo éstas responsables del fenotipo monofásico.

En contraste con la diversidad observada en las regiones RR, SGI-4 fue idéntica en los cuatro aislamientos analizados en este apartado, e idéntica o casi idéntica a las islas genómicas presentes en otras muchas cepas del clon monofásico europeo. Como se comentó anteriormente,

esta isla contiene los *loci arsRSD2A2BCA1D1*, *silESRCFBAGP* y *pcoGEIABCDRSE2*, implicados en la resistencia frente a arsénico inorgánico, plata/cobre y cobre, respectivamente.

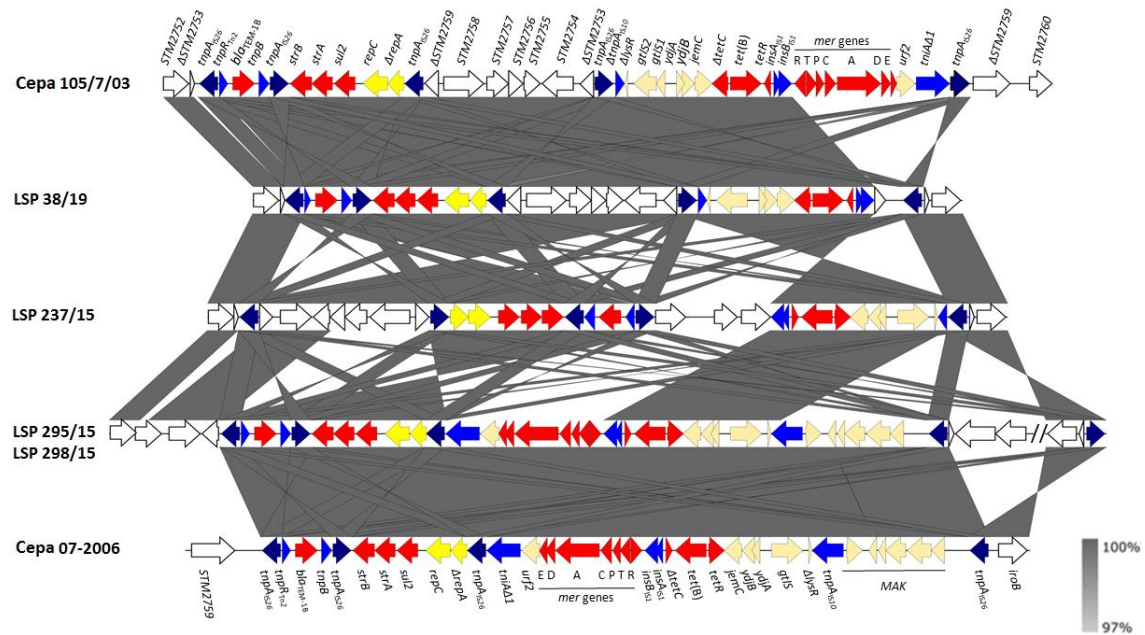


Figura 38. Organización genética de las regiones de tetrarresistencia encontradas en los aislamientos de origen alimentario del clon monofásico europeo resistentes a colistina. El alineamiento se creó con EasyFig BLASTn, incluyendo como referencia las regiones de tetrarresistencia de las cepas 105/7/03 (n° de acceso HQ331538, que se muestra arriba) y 07-2006 (n° de acceso KR856283; que se muestra abajo). Las *orfs* se representan con flechas que apuntan en la dirección de transcripción y tienen diferentes colores en base a su origen o función: blanco, *orfs* del cromosoma Typhimurium LT2 (denominadas de acuerdo al n° de acceso NC_003197); rojo, resistencia; azul, movilidad del ADN, con el gen *tnpA* de IS26 resaltado en azul oscuro; amarillo, genes de replicación plasmídicos; naranja pálido, otras funciones. Las regiones sombreadas gris indican secuencias idénticas entre el 97 y 100% , como se muestra en la escala incluida en la parte inferior derecha de la figura.

4.1.5. Análisis filogenético de los aislamientos monofásicos

El análisis filogenético permitió establecer las relaciones existentes entre los aislamientos pertenecientes a los 3 clones identificados en este trabajo. En la Figura 39 se observan dos clados: A y B. En el clado A se agrupan todos los aislamientos con ST19 (clones español y sud-europeo), mientras que el clado B contiene todos los aislamientos monofásicos ST34 del clon europeo. En el clado A, los aislamientos de los dos clones se separan claramente en dos sub-clados, A1 y A2, correspondientes al clon español y sud-europeo, respectivamente. Como se comentó anteriormente, el número mínimo y máximo de SNPs intra-clon fue de 1 y 103, cero y 144 y de cero y 147, para los clones español, sud-europeo y europeo, respectivamente. Los aislamientos del clon español se diferenciaron de los aislamientos del clon sud-europeo y europeo por un mínimo de 790 (LSP 389/97 versus LSP 52/13 y LSP 197/13) y 763 SNPs (entre

LSP 389/97 y LSP 149/15), y un máximo de 901 (LSP 54/18 y LSP 45/05) y 854 SNPs (LSP 54/18 versus LSP 255/08 y LSP 64/15), respectivamente. Por su parte, los aislamientos pertenecientes a los clones europeo y sud-europeo se diferenciaron por un mínimo de 791 SNP (entre LSP 149/15 y LSP 6/12) y un número máximo de 878 SNPs (LSP 45/05 y LSP 40/13). En conjunto, el número mínimo y máximo de SNPs fue 1 (entre LSP 48/12 y LSP 62/12, ambos pertenecientes al clon español) y 901 (entre los aislamientos LSP 54/18 del clon español y LSP 45/05 del clon europeo, respectivamente).

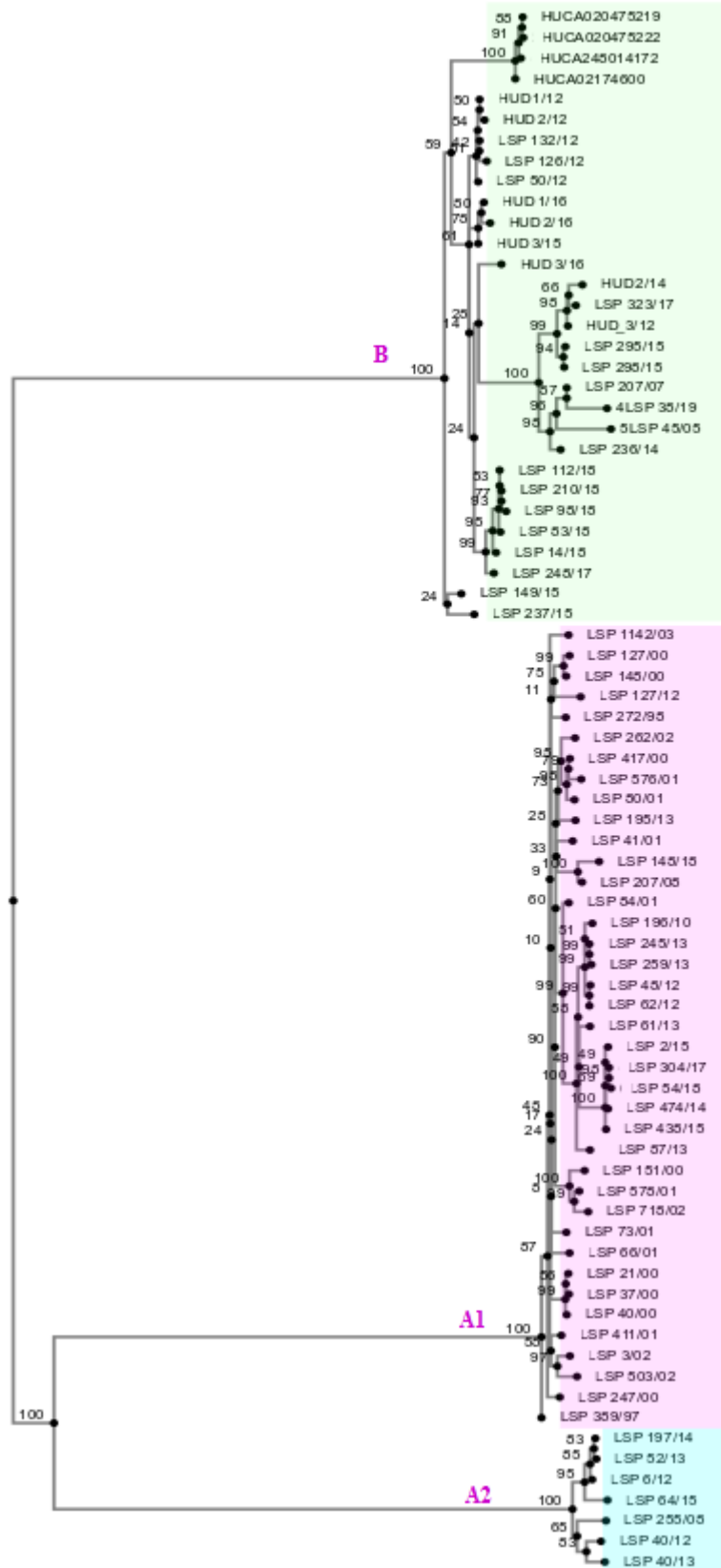


Figura 39. Relaciones filogenéticas entre los aislamientos pertenecientes a los clones español, sud-europeo y europeo basado en el número de SNPs identificados en el genoma completo. En verde se indican los aislamientos del clon europeo; en rosa, los aislamientos del clon español; y en azul, los aislamientos del clon sud-europeo Anexo XVI). Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 1000 réplicas.

4.2. Otros serotipos con resistencias emergentes

En este apartado se seleccionaron aislamientos pertenecientes a diversos serotipos, procedentes de muestras clínicas (Bredeney, Corvallis, Enteritidis, Infantis, Kentucky, Typhimurium, Paratyphi B biovar. Java) o de alimentos (Kedougou y Typhimurium). La selección se realizó en base a su resistencia a fluoroquinolonas, cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas y/o colistina.

4.2.1. Seguimiento epidemiológico en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018

4.2.1.1. Aislamientos de origen clínico

Además de los asignados a la variante monofásica de Typhimurium, ya comentados anteriormente, durante este periodo se detectaron en el PA aislamientos procedentes de muestras clínicas de los serotipos Enteritidis (1.443), Typhimurium (530), Bredeney (11), Corvallis (6), Kentucky (5), Infantis (36), Paratyphi B (45) y Kedougou (1), entre otros. Al igual que el número total de salmonelas, los aislamientos de Typhimurium y Enteritidis, muestran una tendencia claramente descendente en los dos últimos años. El resto de serotipos están relacionados con casos esporádicos, a excepción de Infantis y Paratyphi B, cuya incidencia se mantuvo relativamente constante a lo largo de los años, aunque a distancia muy considerable de los dos serotipos mayoritarios (Figura 40).

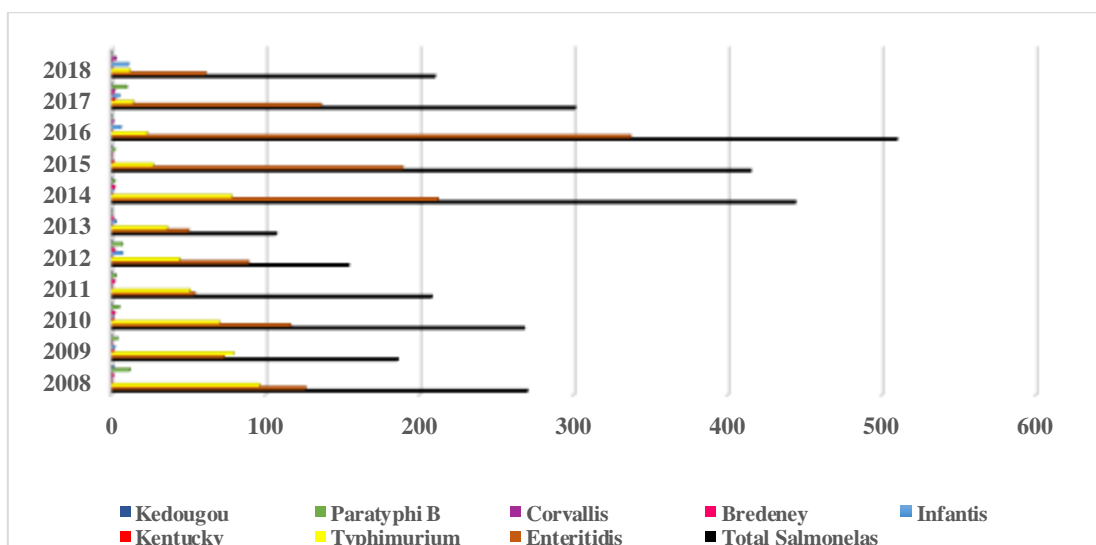


Figura 40. Evolución de los aislamientos de origen clínico pertenecientes a diferentes serotipos analizados en esta Tesis Doctoral, registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018. En la gráfica se representa el número de aislamientos por años (datos cedidos por el LSP).

4.2.1.2. Aislamientos de alimentos

En cuanto a los aislamientos procedentes de muestras de alimentos se observa que en todos los años, excepto 2016 y 2017, Enteritidis fue el serotipo más frecuente (Figura 41). Los serotipos Typhimurium y Enteritidis fueron detectados a lo largo de todo el periodo, mientras que el resto están representados por un número reducido y no constante de aislamientos.

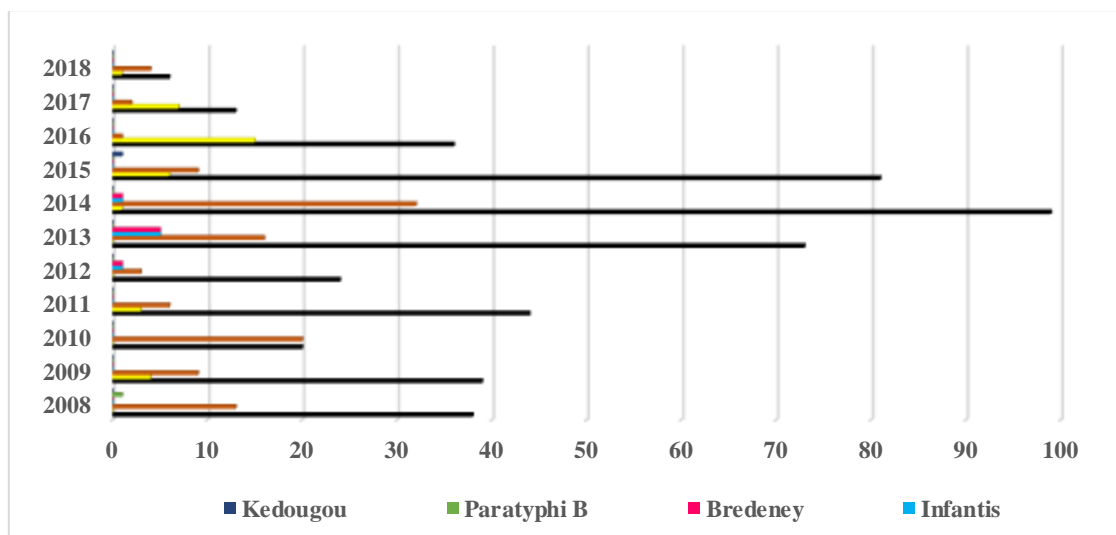


Figura 41. Evolución de los aislamientos pertenecientes a diferentes serotipos analizados en esta Tesis Doctoral, recuperados en el PA de muestras de alimentos, durante el periodo 2008-2018. En la gráfica se representa el número de aislamientos registrados por años (datos cedidos por el LSP).

4.2.2. Secuenciación de genomas

En este apartado se secuenciaron con Illumina un total de 26 aislamientos de distintos serotipos, procedentes de muestras clínicas: Bredeney (2), Corvallis (2), Enteritidis (1), Kentucky (13), Infantis (2), Paratyphi B biovar Java (1), y de alimentos: Kedougou (1) y Typhimurium (4). Los datos referentes al ensamblaje de las lecturas se recogen en el anexo X. En todos los casos, la calidad de las lecturas enviadas por la empresa encargada de la secuenciación fue elevada, obteniéndose un valor Q >20 (ver apartado 3.7.2.1). Los genomas fueron ensamblados con Velvet a través de la web PLACNETw, variando el número de contigs entre 58 y 162. Este y otros parámetros referentes a todos los los ensamblajes se muestran en el anexo X. El tamaño de los genomas secuenciados osciló entre 4.790437 pb y 5.309.364 pb y su contenido GC fue del 53%, aproximadamente. Finalmente, PLACNETw permitió la reconstrucción de los genomas en sus componentes (cromosoma y plásmidos), encontrándose entre cero y cinco plásmidos por aislamiento. Estos genomas fueron anotados con PGAP y depositados en la base de datos Genbank del NCBI bajo los n° de acceso recogidos en el anexo X.

4.2.3. Características generales de los aislamientos con resistencias emergentes

La mayoría de los aislamientos analizados en el presente objetivo de esta Tesis Doctoral procedieron de muestras clínicas, en concreto heces, recuperados en hospitales del PA (HUCA, HUC y HUSA), del País Vasco (HUA y HUD) y de Cantabria (HUMV). El serotipo fue determinado por el CNM para los aislamientos del PA y del País Vasco y, solo a nivel de serogrupo, por el propio hospital en el caso de Cantabria. De acuerdo con la información sobre la resistencia, aportada por los hospitales y confirmada u obtenida experimentalmente en este trabajo, se seleccionaron aislamientos clínicos de los serotipos Kentucky (13), Corvallis (2), Bredeney (2), Enteritidis (1), Infantis (2), Paratyphi B (1) y Typhimurium (2), en base a la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas y/o colistina. Las secuencias tipo, que se muestran en la Tabla 38, fueron identificadas *in silico*.

Tabla 38. Características generales de los aislamientos clínicos analizados en este apartado.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Origen	Paciente ^c		Serotipo	ST
			Sexo	Edad		
HUD 1/09	HUD	Heces	M	35	Kentucky	ST198
HUD 2/09	HUD	Heces	M	2	Kentucky	ST198
LSP 213/09	HUCA	Heces	M	59	Kentucky	ST198
LSP 150/10	HUC	Heces	M	21	Kentucky	ST198
HUD 1/13	HUD	Heces	H	2	Kentucky	ST198
HUD 1/14	HUD	Heces	H	33	Kentucky	ST198
LSP 105/15	HUCA	Heces	H	1	Kentucky	ST198
HUD 1/15	HUD	Heces	H	40	Kentucky	ST198
HUD 1/17	HUD	Heces	M	34	Kentucky	ST198
LSP 235/17	HUSA	Heces	H	74	Kentucky	ST198
LSP 314/17	HUSA	Heces	M	32	Kentucky	ST198
HUA 3/18	HUA	Heces	M	25	Kentucky	ST198
HUA 10/18	HUA	Heces	M	37	Kentucky	ST198
HUD 4/12	HUD	Heces	M	51	Bredeney	ST306
HUMV 1/18	HUMV	Heces	M	70	Bredeney	ST306
HUMV 1/13	HUMV	Heces	M	7	Infantis	ST32
HUMV 1/15	HUMV	Heces	M	4	Infantis	ST32
HUA 5/18	HUA	Heces	M	53	Corvallis	ST1541
HUA 6/18	HUA	Heces	M	6	Corvallis	ST1541
HUD_3_14	HUD	Heces	M	3	Typhimurium	ST19
HUD_2_15	HUD	Heces	H	6	Typhimurium	ST34
HUD 3/09	HUD	Heces	M	1	Enteritidis	ST11
HUMV 1/16	HUMV	Heces	M	16	Paratyphi B	ST110

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública; HUD, Hospital Universitario de Donosti (País Vasco), HUA, Hospital Universitario de Álava (País Vasco); HUMV (Hospital Universitario Marqués de Valdecillas).

b, Hospital Universitario de Donostia (País Vasco), HUA, Hospital Universitario de Álava (País Vasco); HUMV (Hospital Universitario Marqués de Valdecillas); HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, Asturias); HUC, Hospital Universitario de Cabueñes (Gijón, Asturias); HUSA, Hospital Universitario San Agustín (Avilés, Asturias).

c, M, mujer; H, hombre.

También se analizaron tres aislamientos procedentes de alimentos detectados en el PA, dos del serotipo Typhimurium resistentes a cefotaxima (LSP 160/14 y LSP 162/14), y uno de Kedougou resistente a colistina (LSP 136/15). Los 3 fueron obtenidos a partir de muestras de superficie de canal de origen desconocido y su secuencia tipo también se determinó mediante MLST *in silico* (Tabla 39).

Tabla 39. Características generales de los aislamientos procedentes de muestras alimentarias analizados en este apartado.

Aislamiento ^a	Procedencia	Origen	Serotipo	ST
LSP 160/14	LSP	Superficie de canal	Typhimurium	ST34
LSP 162/14	LSP	Superficie de canal	Typhimurium	ST34
LSP 136/15	LSP	Superficie de canal	Kedougou	ST1543

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

La resistencia a antibióticos (genotipo y genes implicados) de todos los aislamientos contemplados en este apartado, excluyendo los de Kentucky que serán comentados posteriormente, se muestra en la Tabla 40. Todos ellos excepto uno, fueron resistentes a tres o más antibióticos y considerados, por tanto, MDR. 10 aislamientos fueron resistentes a cefalosporinas de amplio espectro con o sin resistencia a cefamicinas (10), codificadas por los genes *bla_{CTX-M-1}* (1), *bla_{CTX-M-9}* (1), *bla_{CTX-M-14}* (4), *bla_{CTX-M-65}* (2) y *bla_{CMY-2}* (2). Estas resistencias se encontraron en combinación o no, con otras resistencias emergentes incluyendo colistina (genes *mcr-1* y *mcr-4*, cada uno en un aislamiento) y fluoroquinolonas (mutaciones puntuales en *gyrA*, dando lugar a la sustitución D87Y en un aislamiento o la combinación de mutaciones en los genes cromosómicos en *gyrA*: D87Y y *parC*:T57S, en dos de los aislamientos analizados). Además, en otros dos aislamientos se identificó una mutación en el gen cromosómico *parC* (T57S) acompañada del gen plasmídico *qnrS1*, que confiere susceptibilidad reducida a ciprofloxacino. Cabe destacar que todos los aislamientos considerados MDR mostraron una o más resistencias adicionales incluyendo ampicilina (*bla_{TEM-1B}*), cloranfenicol (*floR*), estreptomina (*strB*, *aadA2*, *aadA5* y *aadA7*), aminoglicósidos (*aacA5*, *aac(3)-IV*, *aph(3')-Iay* *aph(4)-Ia*), sulfonamidas (*sulI* y *sul2*), tetraciclina (*tet(A)* y *tet(C)*), trimetoprim (*dfrA1*, *dfrA14* y *dfrA17*) y/o fosfomicina (*fosA3*, el cual no confirió resistencia).

Todos los genes implicados en la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, fluoroquinolonas y colistina se localizaron en plásmidos. En conjunto, las resistencias a cefalosporinas se detectaron en plásmidos de gran tamaño pertenecientes a los grupos de

RESULTADOS

incompatibilidad IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}, un aislamiento), IncII (*bla*_{CTX-M-14} en cuatro aislamientos y *bla*_{CTX-M-1} en un aislamiento), IncF (*bla*_{CTX-M-14}, un aislamiento), IncP (*bla*_{CTX-M-65}, 2 aislamientos) e IncC (*bla*_{CMY-2}, dos aislamientos), mientras que la resistencia a colistina y la susceptibilidad reducida a ciprofloxacino se asoció a plásmidos IncX4 (*mcr-1*) y ColE (genes *mcr-4* y *qnrS1*) de pequeño tamaño. Finalmente, se detectaron plásmidos de pequeño tamaño en 11 de los 13 aislamientos, de tipo ColE, ColpVC, Col156 o con replicón no identificado, todos ellos crípticos excepto uno que alberga el gen *bla*_{TEM-1B} (HUD 3/14).

Tabla 40. Características generales, fenotipo y genotipo de resistencia de los aislamientos de origen clínico y de alimentos pertenecientes a diferentes serotipos analizados en este trabajo

Aislamiento*	Serotipo	ST	Localización ^b	Tamaño (pb)	Inc ^c	Fenotipo ^d	Genes de resistencia/mutaciones cromosómicas
HUD 3/14	Typhimurium	ST19	Cromosoma pHUD_3_14_1 pHUD_3_14_2	4.872.030 71.405 4.504	- IncFrepb ND	AMP-CTX-STR	aac(6')/laa, aadA2 bla _{CTX-M-44} bla _{TEM-1b}
LSP 160/14	Typhimurium	ST34	Cromosoma pLSP160_14_1 pLSP160_14_2 pLSP160_14_3	4.833.676 126.843 7.989 7.752	- IncI1 ND ND	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP	aac(6')/laa, bla _{TEM-1b} , tet(B) bla _{CTX-M-44} , aadA5, sul1, dfrA17
LSP 162/14	Typhimurium	ST34	Cromosoma pLSP162_14_1 pLSP162_14_2 pLSP162_14_3	4.833.125 128.212 6.851 5.335	- IncI1 ND ND	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP	aac(6')/laa, bla _{TEM-1b} , tet(B) bla _{CTX-M-44} , aadA5, sul1, dfrA17
HUD 2/15	Typhimurium	ST34	Cromosoma pHUD_2_15_1 pHUD_2_15_2 pHUD_2_15_3 pHUD_2_15_4 pHUD_2_15_5	4.910.000 314.678 33.518 6.938 6.851 3.751	- IncH12 IncX4 ND ND ND	AMP, CTX, STR, SUL, TET, TMP, COL	aac(6')/laa, bla _{TEM-1b} , strAB, sul2, tet(B) bla _{TEM-1b} , bla _{CTX-M-8} , aadA2, sul1, tet(A), dfrA16 mcr-1
HUMV 1/13	Infantis	ST32	Cromosoma pHUMV_1_13_1	4.686.236 313.645	- IncP	CTX, CHL, [GEN, KAN], STR, SUL, TET, TMP, NAL, CIP	aac(6')/laa1 [gyrA p.D87Y, parC p.T57S] bla _{CTX-M-8s} , floR, [aac(3)-IV, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia], aadA1, sul1, tet(A), dfrA14
HUMV 1/15	Infantis	ST32	Cromosoma pHUMV_1_15_1	4.682.901 317.684	- IncP	CTX, CHL, [GEN, KAN], STR, SUL, TET, TMP, NAL, CIP	aac(6')/laa1 [parC (p.T57S), gyrA (p.D87Y)] bla _{CTX-M-8s} , floR, [aac(3)-IV, aph(3')-Ia, aph(4)-Ia], aadA1, fosA3, sul1, tet(A), dfrA14
HUD 4/12	Bredney	ST306	Cromosoma pHUD_4_12_1 pHUD_4_12_2 pHUD_4_12_3	4.575.557 223.786 153.794 5.880	- IncH12 IncC ND	AMP, CTX, CHL, STR, SUL, TET, TMP	aac(6')/laa, bla _{TEM-1b} , strAB, tet(B) aadA1, sul1, dfrA1 bla _{qnr-2} , floR, aadA7, sul1, tet(A)
HUMV 1/18	Bredney	ST306	Cromosoma	4.628.323	-	CTX, CHL, STR, SUL, TET, NAL	aac(6')-laa1 parC p.T57S

(Continuación Tabla 40)

										<i>bla_{car}-s</i> , <i>floR</i> , [<i>strAB</i> , <i>aadA7</i>], [<i>sulf1</i> , <i>sul2</i>], <i>tet(A)</i>
										-
										<i>aac(6)-Iaai/parC</i> p.T57S
										<i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
										qnrS1
										-
										-
										-
										<i>aac(6)-Iaai/parC</i> p.T57S
										<i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
										qnrS1
										-
										-
										<i>aac(6)-Iaai/gyrA</i> (p.D87Y)
										<i>bla_{ctx-M-14}</i>
										-
										-
										<i>aac(6)-Iaa</i>
										<i>bla_{ctx-M-1}</i>
										-
										<i>aac(6)-Iy</i>
										mcr-4
										<i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dftrA14</i>
										-
										-

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública; HUD, Hospital Universitario de Donostia (País Vasco); HUA, Hospital Universitario de Álava (País Vasco).

b, p, plásmido.

c, Inc, grupo de incompatibilidad plasmídico; ND, no determinado.

d, AMP, ampicilina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; COL, colistina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; STR, estreptomycin a; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino.

4.2.4. Aislamientos del clon emergente ST198 del serotipo Kentucky con resistencia a ciprofloxacino

En este trabajo se analizaron un total de 13 aislamientos pertenecientes al serotipo Kentucky, seleccionados en base a los valores de CMI de ciprofloxacino $> 2 \mu\text{g/ml}$ (Cip^R). Todos ellos fueron recuperados entre 2008 y 2018 a partir de muestras fecales de pacientes con gastroenteritis, atendidos en cinco hospitales de dos comunidades del Norte de España (Principado de Asturias y País Vasco) o en centros de atención primaria asociados con ellos (Tabla 41). Los 13 aislamientos fueron secuenciados y caracterizados experimentalmente. En seis de los pacientes se documentó un viaje previo a un país africano (Marruecos, Tanzania y Sudáfrica) o a Bali (Indonesia) antes de presentarse la enfermedad. Para el resto de pacientes este no fue el caso o la información se desconoce (Tabla 41).

4.2.4.1. Caracterización general de los aislamientos

La serotipificación de los aislamientos fue llevada a cabo de manera experimental en el CNM para aislamientos del Principado de Asturias y del HUD o en el propio hospital (HUA, solo a nivel de serogrupo) y confirmada *in silico* con SeqSero. Todos ellos se asignaron a ST198 mediante MLST realizado *in silico*. La determinación de la susceptibilidad/resistencia frente a los antibióticos, reveló seis fenotipos de resistencia (Tabla 41). De acuerdo con el criterio de selección todos ellos fueron resistentes a ciprofloxacino (con CMIs entre 6 y $>32 \mu\text{g/ml}$) y ácido nalidíxico. También se observaron resistencias a otros antibióticos, incluyendo ampicilina, gentamicina, estreptomicina, sulfonamidas y tetraciclina, que se presentaron en diferentes combinaciones. En el clon ST198-Cip^R del serotipo Kentucky, estas resistencias se han asociado a la isla genómica SGII-K o variantes de la misma como SGII-P. El fenotipo más común, fue compartido por seis aislamientos, y comprende todas las resistencias codificadas por SGII-K. Además, un único aislamiento (LSP 213/09) presentó resistencia a cloranfenicol, mientras que no se detectaron resistencias a cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos o colistina. La presencia de plásmidos se detectó en nueve aislamientos, en números que van desde uno (LSP 213/09 y HUD 1/13) hasta seis (HUA 18/10). Un plásmido de 85,3 Kb, encontrado en este último aislamiento, perteneció al grupo de incompatibilidad IncI. El resto de plásmidos presentaron un tamaño inferior a 10,5 Kb y pertenecen a los grupos de incompatibilidad ColpVC, ColE, Col156 o contienen un replicón no identificado. Además de los genes de resistencia asociados a SGII-K, de localización cromosómica, se detectó el gen *catA1* en el único aislamiento resistente a cloranfenicol (LSP 213/09). Este gen fue localizado en un contig de 5,1 Kb de origen cromosómico, ya que el aislamiento contiene un único plásmido ColpVC de 4,1 Kb. Dicho contig está flanqueado por IS1 e IS26: Un segmento del contig, de 4,9 Kb, que

excluye a IS26 y consta de IS1, *catA1*, *tnpA_{Tn21}* y Δ *tnpR_{Tn21}*, es idéntico a regiones localizadas tanto en plásmidos como el cromosoma de cepas pertenecientes a diferentes serotipos de *S. enterica*, como Typhimurium, Wien, Virchow, Typhi y Paratyphi B.

4.2.4.2. Bases genéticas de la resistencia a ciprofloxacino

Los 13 aislamientos caracterizados en este trabajo contienen 4 mutaciones en las QRDRs de genes de topoisomerasas, 2 en *gyrA* y 2 en *parC*. Una de las mutaciones que afectan al gen *gyrA* (que provocó la sustitución Ser83Phe en la proteína) y las 2 mutaciones en *parC* (sustituciones Ser80Ile y Thr57Ser) fueron compartidas por todos los aislamientos. Sin embargo, se detectaron 3 sustituciones diferentes que afectaron al codón 87 de *gyrA*, dando lugar a los cambios Asp87Asn, Asp87Tyr y Asp87Gly en 10, 2 y 1 aislamiento, respectivamente. Como se indicó anteriormente, los valores de las CMI de los aislamientos analizados oscilaron entre 6 hasta >32 mg/ml. Se analizaron por ello, mediante análisis *in silico*, mutaciones en otros genes de resistencia a fluoroquinolonas que podrían justificar estas diferencias. En concreto, se analizaron genes que codifican bombas de expulsión, incluidas las regiones promotoras, y genes implicados en su regulación; genes de porinas y el gen que codifica la subunidad β del enzima ARN polimerasa, todos ellos relacionados previamente con dicha resistencia. El análisis realizado reveló mutaciones únicas en los genes *acrR*, que codifica un regulador local de la bomba de eflujo AcrAB-TolC, y *marC*, de función desconocida, en LSP 235/17, el aislamiento con la CMI más alta para ciprofloxacino (>32 mg/ml). Un cambio de G→A en cada uno de estos genes llevó a la sustitución conservativa de Val por Ile en las proteínas, por lo que es poco probable que el elevado valor de la CMI se deba dicho cambio. No se observaron alteraciones en genes estructurales o reguladores (*acrA*, *acrB*, *acrS*, *acrE*, *acrF*, *tolC*, *ramR*, *ramA*, *soxR*, *soxS*, *marR*, *marA*, y *rob*), para otras bombas de expulsión, incluidas las regiones de sus promotores ni mutaciones en el gen *ipoB*. Tampoco se detectaron genes PMQR y, por lo tanto, las causas de la variación en las CMI a ciprofloxacino de los aislamientos de Kentucky de momento se desconocen.

Tabla 41. Origen y características de los aislamientos ST198 de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky procedentes de hospitales del norte de España.

Aislamiento ^a	Viajes realizados ^b	Fenotipo de resistencia ^c	Genes SGI1-K Otros genes	CIP CMI (μ g/mL)	Sustitución de aminoácidos		Plásmidos Inc (Tamaño (pb)) ^d
					GyrA	ParC	
HUD 1/09	Tanzania	GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>aacA5-aadA7-strB-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	6	Ser83Phe Asp87Tyr	Thr57Ser Ser80Ile	ni
HUD 2/09	Sud-África	AMP- GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>bla_{TEM-1B}-aacA5-aadA7-strB-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	8	Ser83Phe Asp87Tyr	Thr57Ser Ser80Ile	ni

(Continuación Tabla 41)

HUD 1/13	nth	AMP-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aac(6)-laa</i>	8	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	nd (1145)
HUD 1/14	nth	AMP-GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aacA5-aadA7-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	12	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ColE (4132); nd (3372 y 4010)
HUD 1/15	nth	AMP-GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aacA5-aadA7-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	12	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ColE (2504); nd (3371, 3904 y 4179)
HUD 1/17	Marruecos	TET-NAL-CIP	<i>tet(A)-aac(6)-laa</i>	8	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ColE (2448); nd (4110)
LSP 213/09	na	CHL-TET-NAL-CIP	<i>tet(A)-catA1, aac(6)-laa</i>	8	Ser83Phe Asp87Gly	Thr57Ser Ser80Ile	ColpVC (4110)
LSP 150/10	na	AMP-GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aacA5.aadA7-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	12	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ColE (5058); Col156 (5769); nd (10524)
LSP 105/15	na	AMP-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aac(6)-laa</i>	16	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ni
LSP 235/17	na	TET-NAL-CIP	<i>tet(A)-aac(6)-laa</i>	>32	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	nd (3893 y 4631)
LSP 314/17	na	AMP- GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aacA5-aadA7-strA-strB-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	12	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ni
HUA 3/18	na	AMP-GEN-STR-SUL-TET-NAL-CIP	<i>blaTEM-1B-aacA5-aadA7-sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	12	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	ColE (4020); nd (2117 y 3985)
HUA 10/18	na	SUL-TET-NAL-CIP	<i>sul1-tet(A)-aac(6)-laa</i>	8	Ser83Phe Asp87Asn	Thr57Ser Ser80Ile	Incl1 (85307); ColE (4105); nd (2185, 3985, 4164 y 5413)

a, Los aislamientos se indican con las iniciales del lugar de procedencia seguido del número de recolección/ dos últimos números del año en el que fueron recogidos. LSP, Laboratorio de Salud Pública (PA), actuando como centro de referencia regional de *Salmonella*; Los aislamientos del LSP proceden del “Hospital Universitario Central de Asturias”, Oviedo, Asturias (LSP 213709 y LSP 105/15), “Hospital Universitario de Cabueñes”, Gijón, Asturias (LSP 150/10 y LSP 314/17); y “Hospital Universitario San Agustín”, Avilés, Asturias (LSP 235/17). HUD, “Hospital Universitario de Donostia”, País Vasco; HUA, “Hospital Universitario de Álava”, País Vasco.

b, nth: historia de viaje no disponible (no travel history); na, información no disponible (information not available).

c, AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; GEN, gentamicina; STR, estreptomina; SUL, sulfonamidas; TET, tetraciclina; NAL, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacino.

d, Inc, grupo de incompatibilidad; nd, plásmidos no detectados; ni, grupo de incompatibilidad no identificado.

4.2.4.3. Diversidad de la isla genómica SGI1-K

La diversidad de fenotipos de resistencia mostrada por los aislamientos clínicos de Kentucky analizados en este trabajo se asoció con la elevada variabilidad de SGI1-K. Como se muestra en la Figura 42, cada aislamiento presentó una variante SGI1-K diferente,

distinguiéndose en cuanto a estructura y/o contenido de genes de resistencia. La isla genómica de LSP 314/17 fue la única que coincidió con el prototipo de SGI1-K. Las variaciones observadas en el resto de aislamientos comprenden deleciones e inversiones de tamaño variable, que afectaron a diferentes componentes de la región de resistencia, al esqueleto de SGI1 y/o al ADN cromosómico flanqueante en el extremo *uidY*, en el caso de HUD 1/17 y LSP 235/17. Por otro lado, las islas de HUD 1/13 y LSP 105/15 se encuentran estrechamente relacionadas. Ambas portan un transposón de tipo Tn2 que contiene *bla_{TEM-1}* como único gen de resistencia, coincidiendo con lo descrito previamente para SGI1-P. En comparación con el prototipo de SGI1-K, la mayoría de las islas caracterizadas en este trabajo contienen una copia de IS26 entre una región de resistencia delecionada y frecuentemente invertida y la parte anterior del esqueleto de SGI1-K, el cual también está delecionado en todos los aislamientos excepto LSP 150/10. En tres aislamientos se detectó una copia de IS26 dentro del esqueleto de la isla (LSP 235/17, HUD 1/13 y LSP 105/15) y en un aislamiento (LSP 213/09) el extremo 5' final de este se encuentra interrumpido por la región de resistencia y un segundo segmento, ahora contiguo al extremo 3', aparece invertido. En el total de los aislamientos, se identificaron 38 copias de IS26, en consonancia con el papel esencial de este elemento en la remodelación de regiones de resistencia y creación de nuevas variantes.

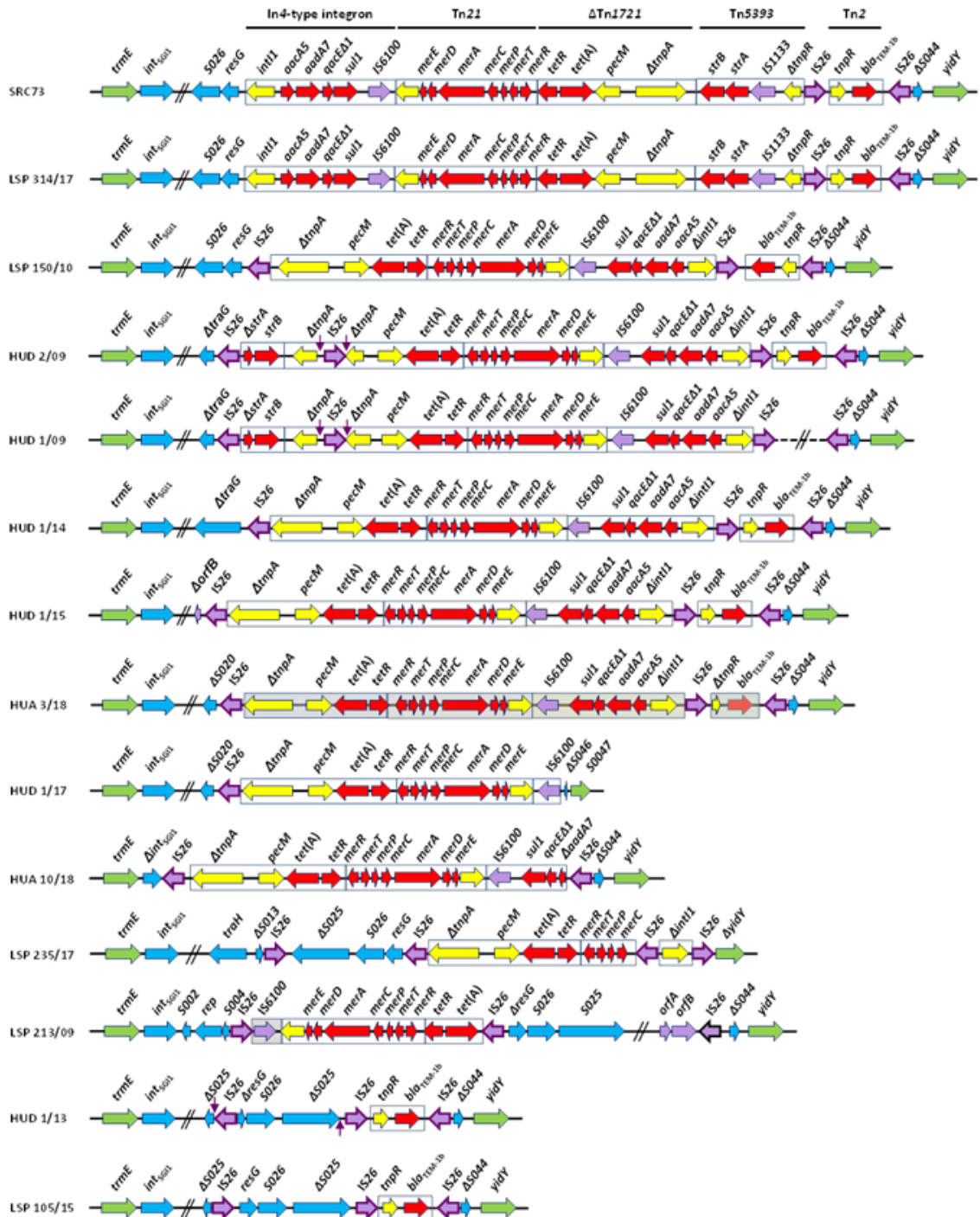


Figura 42. Variación de SGI1-K (SGI1-P) en *Salmonella enterica* serotipo Kentucky ST198-Cip^R de hospitales españoles. Las regiones de codificación están representadas por flechas apuntando en la dirección de transcripción y teniendo diferentes colores según su función. Verde, ADN cromosómico flanqueante; azul, esqueleto de SGI1; rojo, genes de resistencia; amarillos, transposones e integrones y genes distintos de los genes de resistencia; púrpura, secuencias de inserción con IS26 resaltado por un borde más oscuro. Los sitios duplicados se indican mediante flechas verticales. Las líneas horizontales contiguas cruzadas por dos líneas oblicuas paralelas indican que no se muestran todos los genes. En HUD 1/09, la línea punteada cruzada por dos líneas oblicuas paralelas indica que se desconoce la secuencia correspondiente. LSP, Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias, actuando como centro regional de referencia para *Salmonella*. Los aislamientos de LSP proceden del “Hospital Universitario Central de Asturias”, Oviedo, Asturias (LSP 213/09 y LSP 105/15), “Hospital Universitario de

Cabueñes”, Gijón, Asturias (LSP 150/10 y LSP 314/17) y “Hospital Universitario San Agustín”, Avilés, Asturias (LSP 235/17). HUD, “Hospital Universitario Donostia”, País Vasco; HUA, “Hospital Universitario de Álava”, País Vasco.

4.2.4.4. Relación filogenética entre los aislamientos

Como se muestra en la Figura 43, los 13 aislamientos de hospitales españoles se encuentran estrechamente relacionados, diferenciándose en un mínimo de dos SNPs (HUD 1/13 versus LSP 105/15) y un máximo de 160 SNP (LSP 213/09 frente a LSP 235/17). Sin embargo, se observa que se separan en dos clados, uno que incluye nueve aislamientos procedentes de cinco hospitales y otro que comprende los cuatro restantes detectados en tres hospitales.

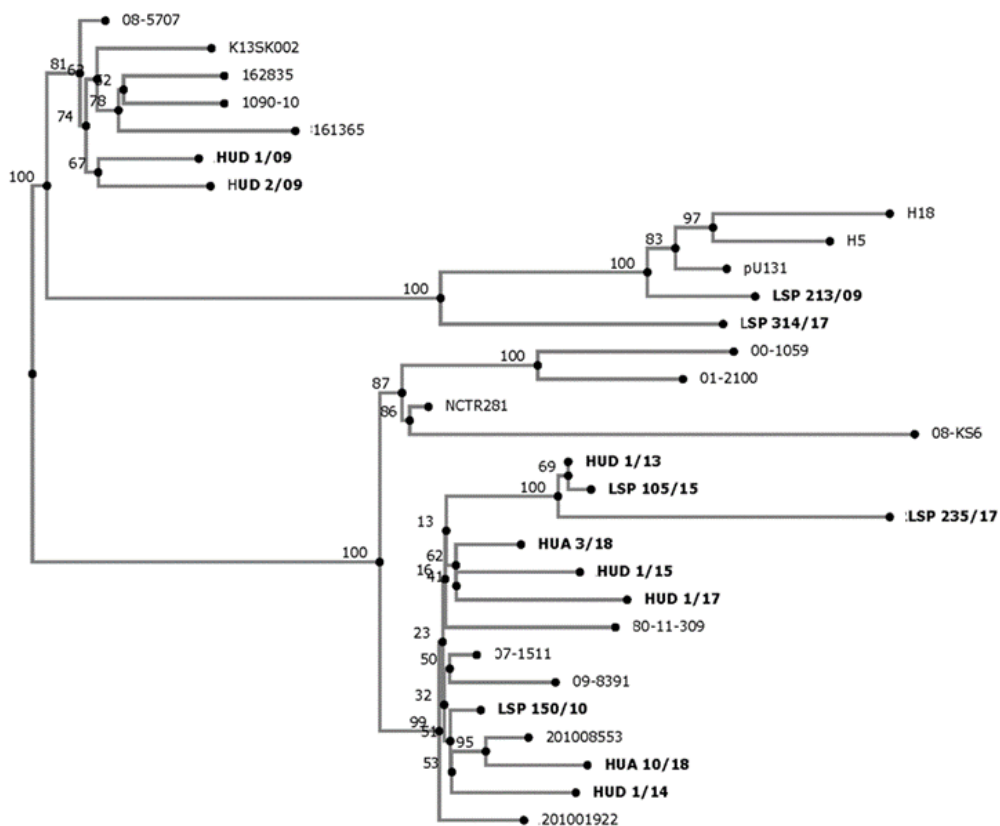


Figura 43. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre los aislamientos de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky ST198-Cip^R de hospitales españoles (resaltados en negrita) y otros aislamientos de Kentucky ST198. El análisis basado en los SNPs del genoma completo utilizando el genoma de la cepa 201001922 de Kentucky (nº de acceso CP028357) como referencia (Anexo XVII). Los números de los nodos representan los valores de “bootstrap” basados en 1000 réplicas.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. The largest set is at the top right, a medium-sized set is in the middle, and a large set is at the bottom right. Two thin, dark pink lines originate from the top left and extend diagonally towards the middle set of circles.

DISCUSIÓN

“La historia de las ciencias nos demuestra que las teorías son perecederas. Con cada nueva verdad revelada, tenemos una mejor comprensión de la naturaleza y, nuestras concepciones y nuestros puntos de vista se modifican”

(Nikola Tesla)

En los últimos años, la secuenciación de genomas completos está revolucionando el conocimiento de las bacterias patógenas, gracias al desarrollo de los métodos de segunda generación, el abaratamiento de los costes y los avances en el análisis bioinformático. De hecho, en el presente trabajo se han podido secuenciar 100 genomas de *S. enterica*, utilizando Illumina, que es la técnica de secuenciación de segunda generación más común hoy en día. Otros dos aislamientos se secuenciaron con SMRT-PacBio que, a pesar de su elevado coste, permitió superar los problemas de ensamblaje planteados por Illumina. Esto resultó esencial, por ejemplo, para determinar la organización completa del plásmido característico del clon español.

Entre otras muchas aplicaciones, el análisis genómico se está convirtiendo en una herramienta esencial para el seguimiento de las bacterias patógenas, así como para la detección y el estudio de brotes, en lo que se conoce como epidemiología genómica. De hecho, algunas de las técnicas de tipificación más importantes, como la determinación del serotipo y el MLST, pueden actualmente realizarse *in silico*, con total precisión. Esto simplifica enormemente el trabajo experimental, así como la demanda de recursos materiales y personal de laboratorio. Otras técnicas de tipificación, de gran relevancia epidemiológica y amplia utilización, como son PFGE, MLVA o la fagotipificación, no han podido implementarse *in silico*, al menos de momento. PFGE y el MLST se han utilizado durante muchos años como “standard de oro” para el seguimiento de las bacterias patógenas y detección de brotes. Sin embargo, PFGE es una técnica laboriosa y la comparación de resultados entre laboratorios resulta difícil. Por otro lado, el MLST experimental, basado en 7 loci, tiene un precio elevado, además de requerir mucho tiempo. En contraposición, el análisis genómico ha permitido introducir nuevos métodos de tipificación con un poder de discriminación muy superior al de cualquiera de las técnicas experimentales tradicionales. Entre ellos destacan cgMLST (“core genome”), wgMLST (“whole genome”) y SNPs (Tang *et al.*, 2019). Los dos primeros amplían enormemente el número de *loci* incluidos en el esquema de tipificación, y por tanto la discriminación, centrándose en los pertenecientes al genoma *core* o a la totalidad del genoma (Alikhan *et al.*, 2018; Pearce *et al.*, 2020; Payne *et al.*, 2020). Otra manera de explotar la genómica con fines de tipificación se basa en la identificación de SNPs, que varían de unos aislamientos a otros y se detectan por comparación con un genoma de referencia (Saltikova *et al.*, 2018).

El análisis genómico se está utilizando, además, para el seguimiento de la resistencia a antimicrobianos. De especial interés es la capacidad de predecir, de manera rápida y correcta, la susceptibilidad/resistencia de una bacteria patógena frente a antimicrobianos de relevancia clínica, por su posible aplicación como herramienta de diagnóstico (Köser *et al.*, 2014). Sin embargo, en ocasiones aún se requiere contrastar la información generada mediante análisis genómico con los datos conseguidos por métodos fenotípicos o genotípicos convencionales (Ellington *et al.*, 2017). El análisis genómico permite, además, la identificación de factores de

virulencia que, junto con la resistencia, puedan ayudar a entender el éxito alcanzado por determinados clones con respecto de otros. En base a lo expuesto, en esta Tesis Doctoral se combinó el análisis genómico con el trabajo experimental para profundizar en el conocimiento de *S. enterica*, una importante bacteria patógena. Con la finalidad de facilitar la discusión de los resultados obtenidos, esta sección se ha dividido en 3 apartados: epidemiología, variante monofásica de Typhimurium y otros serotipos de *S. enterica*.

5.1. Epidemiología

Según el último informe emitido por la EFSA, la salmonelosis ocupa el segundo lugar entre las zoonosis más notificadas en la UE, solamente por detrás de las campilobacteriosis, causadas por bacterias del género *Campylobacter*. Constituye, además, la primera causa de brotes de transmisión alimentaria de forma que el 50,5% de las hospitalizaciones asociadas con ellos fueron debidas a serotipos no tifoideos de *S. enterica*. (EFSA, 2021). A pesar de esto, cabe destacar que durante los últimos 5 años la tendencia de las salmonelosis en la UE se ha estabilizado, tras un largo periodo de descenso en el número de casos registrados. Así, en el año 2019 se notificaron 87.923 casos, valor similar al observado a partir de 2013. En el PA, no se alcanzó la estabilización registrada en la UE, pero si se detectó una importante disminución en 2017, que fue aún mayor en 2018. Esta tendencia favorable se debe probablemente a las medidas adoptadas en España, al igual que en otros países de la UE, para cumplir con los criterios de seguridad alimentaria contemplados en el Reglamento (EC) No 2073/2005 (2015). Estos se engloban dentro de la legislación integrada de la UE destinada a la monitorización y control de *Salmonella* a lo largo de la cadena alimentaria (Hugas and Beloeil, 2014).

Durante los últimos tres años para los que hay datos disponibles (2017 a 2019), la variante monofásica de Typhimurium, objeto principal del presente trabajo, fue el tercer serotipo más frecuentemente identificado en muestras clínicas, tanto en la UE como en España (8,2 y 8,1 %, respectivamente), solamente superado por los serotipos Enteritidis (50,3 y 49,9%, respectivamente) y Typhimurium (11,9 y 13%, respectivamente). Conjuntamente, estos tres serotipos representan el 70,3% de los casos notificados en humanos en la UE (EFSA, 2021; Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020). A diferencia de ello, los datos correspondientes al PA revelaron que, a partir del año 2013, la variante monofásica se situó en segundo lugar, desplazando a Typhimurium, que muestra una acusada tendencia descendente. Sorprendentemente, en el año 2018 la variante monofásica sobrepasó incluso a Enteritidis, convirtiéndose en el serotipo más frecuentemente detectado en muestras clínicas de nuestra comunidad (Figura 44). Esta tendencia se mantuvo también para el año 2019, no incluido de manera sistemática en el presente trabajo. En concreto, durante este año, se detectaron un total de

224 casos de salmonelosis clínicas, de las cuales 32,6, 24,1 y 7,1% correspondieron a la variante monofásica (73), Enteritidis (54) y Typhimurium (16), respectivamente.

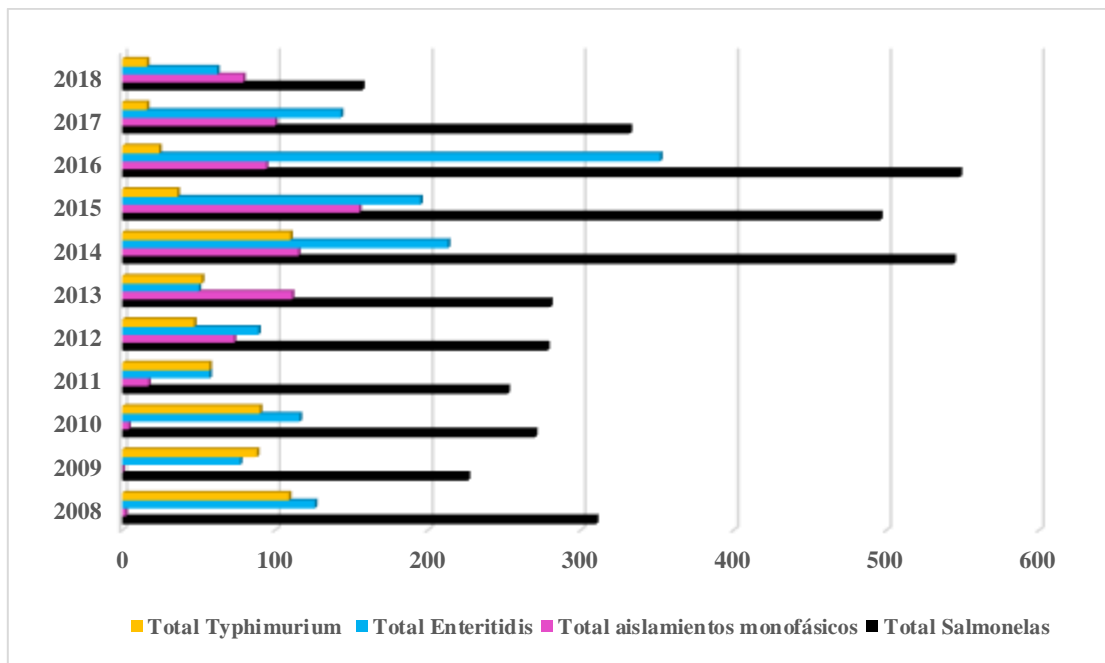


Figura 44. Número de aislamientos de origen clínico pertenecientes a *Salmonella enterica*, así como a los serotipos Enteritidis, Typhimurium y la variante monofásica, registrados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018 (Basada en datos cedidos por el Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias).

En cuanto a los otros serotipos analizados en esta Tesis Doctoral, en la UE durante el periodo 2017-2019, Infantis ocupó la 4ª posición como responsable de infecciones humanas, Kentucky y Paratyphi B biovar Java se situaron entre los 25 más frecuentes y el resto (Corvallis, Bredeney, Kedougou) mostraron una incidencia aún menor (EFSA, 2021). En el PA, los más frecuentes fueron Infantis y Paratyphi B, aunque a mucha distancia de los tres mayoritarios.

En la UE, la distribución en muestras de animales y alimentos reveló que Infantis tuvo la mayor incidencia (29,7%), seguido de Enteritidis (6,9%), la variante monofásica (4,5%) y Typhimurium (3,9%). En el PA, los datos disponibles deben tomarse con precaución, ya que no todos los tipos de alimentos se muestrean por igual. Teniendo esto en cuenta, es importante destacar que el número total de aislamientos mostró una tendencia ascendente entre 2008 y 2014. A partir de aquí, disminuyó de manera considerable, detectándose únicamente 13 y 6 en 2017 y 2018, respectivamente. La variante monofásica alcanzó también el máximo en 2015, para después disminuir después en paralelo al número total de aislamientos (Figura 45).

Cabe destacar, finalmente, que el género *Salmonella* ocasionó el 17,9% de los brotes alimentarios notificados en la UE, de los cuales la gran mayoría (72,4%) fueron atribuidos al serotipo Enteritidis. Los alimentos implicados con mayor frecuencia fueron huevos y derivados,

seguido de productos de panadería, carne de cerdo y derivados, así como carne mixta. En el PA, durante el periodo 2008-2018 se detectaron un total de 15 brotes, la mayoría causados por Enteritidis (12), al igual que en la UE. Otros dos se debieron a la variante monofásica y uno al serotipo Rissen. La etiología solo se pudo conocer en 5 de los brotes, en los cuales los alimentos implicados fueron huevos, pasteles y marisco (en 4 brotes de Enteritidis) y carne de cerdo (en uno de los brotes del clon europeo de la variante monofásica).

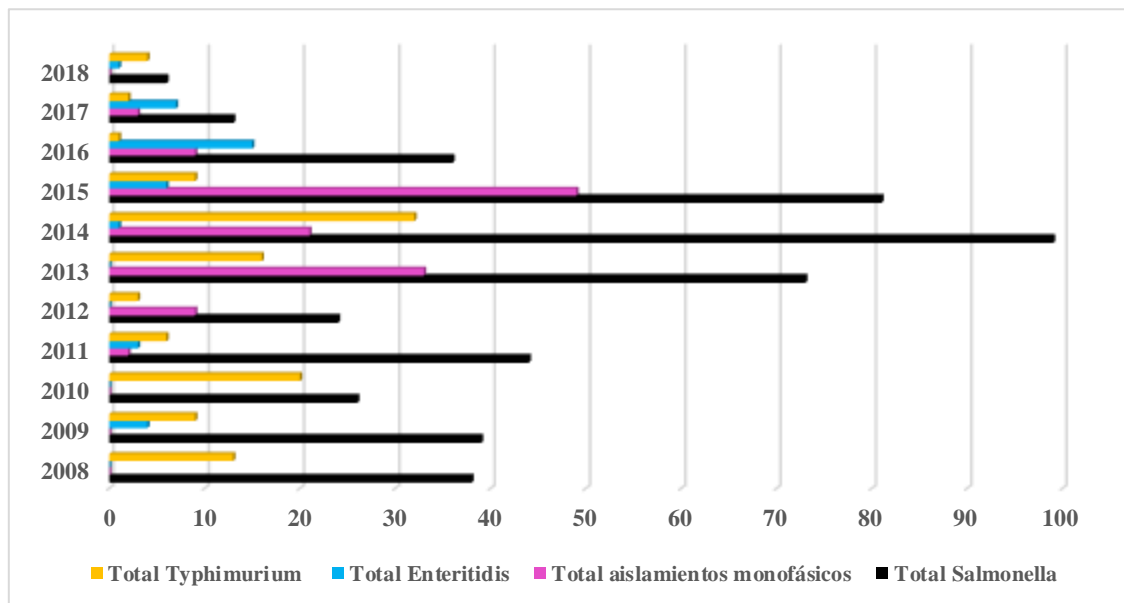


Figura 45. Aislamientos pertenecientes a los serotipos Enteritidis, Typhimurium y su variante monofásica procedentes de alimentos muestreados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018 (Datos cedido por el LSP).

5.2. Variante monofásica de Typhimurium

Durante las últimas 6 décadas, la epidemiología de Typhimurium y su variante monofásica en la UE se ha caracterizado, por oleadas sucesivas de clones dominantes, pertenecientes a fagotipos concretos. Estas oleadas se prolongan entre 10 y 15 años, llegando el clon dominante a representar hasta el 50% de los aislamientos de Typhimurium notificados en el pico de la epidemia (Branchu *et al.*, 2018). Así, a partir de 1965, los fagotipos DT9, DT204, DT193 y DT104 se fueron sucediendo a lo largo del tiempo. Si bien se desconocen las razones del ascenso, declive y sustitución de unos clones por otros, se han identificado dos características comunes a todos ellos. Por un lado, la MDR, esto es la resistencia frente a múltiples antimicrobianos, y por otro un rango de hospedador relativamente amplio (Rabsch *et al.*, 2001). Esta sucesión de clones epidémicos también se ha observado en la variante monofásica de Typhimurium, desde su aparición en la década de los 90. El primer aislamiento monofásico descrito en la UE se detectó en España (clon español) en 1997, asociado a cerdos y productos

derivados, y se asignó mayoritariamente al fagotipo U302 (de la Torre *et al.*, 2003; Soyer *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2011; García *et al.*, 2011, 2013, 2014). Posteriormente, el clon europeo, cuyos principales fagotipos son DT193 y DT120, consiguió desplazar no solo al clon español, sino también a los clones bifásicos de Typhimurium, entre ellos el DT104 que había alcanzado una dispersión global. El clon europeo surgió en 2005 en Europa, también en poblaciones de cerdos, al igual que el español, pero después se dispersó a ganado vacuno y, en menor medida, también a aves de corral (Hauser *et al.*, 2010; Elnekave *et al.*, 2018). A diferencia del clon español, detectado principalmente en la Península Ibérica, el clon europeo se dispersó a nivel mundial, siendo actualmente mayoritario en todos los continentes. Por su parte, el clon sud-europeo no llegó a alcanzar el nivel de dispersión del español y menos aún del europeo. Así, aislamientos de este clon solo se han encontrado, de manera esporádica, en países del sur de Europa como España, Portugal e Italia (García *et al.*, 2014; Mourao *et al.*, 2014).

Los aislamientos monofásicos analizados en el presente trabajo se distribuyeron entre los tres clones: español, sud-europeo y europeo, siendo este último claramente mayoritario en el momento actual. La mayoría de los pertenecientes al clon español se adscribieron al fagotipo U302, de acuerdo con lo descrito previamente para este clon (Echeita *et al.*, 1999, 2001; de la Torre *et al.*, 2003; Laorden *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011, 2013). Sin embargo, también se identificó un aislamiento perteneciente a DT193 y un número reducido de aislamientos no tipificables con el panel de bacteriófagos utilizado. Por su parte, los aislamientos del clon monofásico europeo analizados en esta tesis mostraron una elevada heterogeneidad en cuanto al fagotipo. El más frecuente fue DT138, seguido de U311, DT195, DT193, DT120 y DT104B, entre otros cuya representación fue minoritaria. También se encontraron aislamientos RDNC, cuyos patrones de lisis no se ajustaron a ningún fagotipo concreto. En cuanto a los dos fagotipos más frecuentes, DT138 había sido descrito en aislamientos de alimentos derivados de carne de cerdo, detectados en distintos países, incluidos España, Suecia y USA (Campos *et al.*, 2019), mientras que U311 se identificó como fagotipo mayoritario en aislamientos procedentes de cerdos, aves salvajes, roedores y muestras ambientales de granjas entre 2008 y 2012 en España (Andrés-Barranco *et al.*, 2016). Cabe destacar que los fagotipos más frecuentemente asociados al clon europeo, DT193 y DT120, en este estudio ocuparon la tercera y cuarta posición (Hopkins *et al.*, 2010; EFSA, 2010; Hopkins *et al.*, 2010; Gallati *et al.*, 2013; Petrovska *et al.*, 2016). Estos resultados demuestran la dispersión en el PA de una nueva variante del clon europeo con fagotipo DT138. Finalmente, los aislamientos del clon sud-europeo presentaron una alta heterogeneidad en cuanto al fagotipo, exhibiendo mayoritariamente patrones de lisis que no se corresponden con ningún fagotipo concreto (RDNC), aunque también se han asociado a DT18, DT104 y DT120.

La fagotipificación es una técnica compleja que requiere personal especializado tanto para su realización como para la interpretación de los resultados. Además, es necesario disponer

de la colección de bacteriófagos específicos para cada uno de los serotipos donde la técnica se ha puesto a punto (que son solo los mayoritarios). Por todo ello, esta técnica solo se lleva a cabo en centros nacionales de referencia, como el CNM. Las dificultades expuestas, unidas al auge de las técnicas de tipificación *in silico*, hicieron que en España se dejara de determinar el fagotipo a partir del año 2017. En cuanto a estas últimas, en este trabajo, se llevó a cabo la determinación del MLST *in silico* de todos los aislamientos secuenciados. Los pertenecientes al clon español y al clon sud-europeo, tanto de origen clínico como de alimentos, se asignaron a la secuencia tipo ST19. Por otro lado, todos los pertenecientes al clon europeo fueron ST34. Estos resultados coinciden con los descritos previamente en la literatura (Sun *et al.*, 2019), indicando que los clones monofásicos surgieron a partir de aislamientos bifásicos del serotipo Typhimurium con ST19, en el caso de los clones español y sud-europeo, o ST34 para el clon europeo. De acuerdo con ello, el árbol filogenético construido en el presente trabajo (ver Figura 39) muestra la separación de los aislamientos ST19 y ST34 en dos clados independientes. Además, respalda el hecho de que los clones español y sud-europeo comparten un antecesor común, aunque los miembros de uno y otro clon agrupan por separado.

El mayor o menor éxito epidemiológico alcanzado por los tres clones monofásicos se debe, sin duda, a ventajas selectivas aportadas por factores diferenciales, que incrementen la eficacia biológica de un determinado clon en un momento dado. La adquisición de genes de resistencia a antibióticos precede normalmente a la dispersión y expansión clonal de los patógenos bacterianos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los tres clones monofásicos, al igual que los bifásicos predominantes en tiempos anteriores, comparten perfiles de resistencia a antibióticos similares, incluyendo ampicilina, estreptomicina sulfonamidas, tetraciclina, con o sin cloranfenicol y otras resistencias adicionales. Por ello, aunque la resistencia a antibióticos se considera un factor clave en la selección inicial de estos clones, deben existir fuerzas adicionales que expliquen la aparición de uno nuevo que, en poco tiempo, consigue reemplazar al que había sido dominante hasta entonces. La transferencia genética horizontal se considera un factor clave en su evolución, al aportar nuevos genes o combinaciones de genes con capacidad para modificar las características de las bacterias (Polz *et al.*, 2013). En el caso del clon español, clave para su éxito fue la adquisición, por transferencia horizontal, del antecesor de pUO-STmRV1. El plásmido actual, además de genes de resistencia a antibióticos aporta numerosos genes de resistencia a metales pesados y otros biocidas. La resistencia a estos compuestos pudo también contribuir a la selección y posterior dispersión del clon, ya que muchos de ellos son utilizados en los sistemas de producción de alimentos, particularmente de origen animal, como se comentará más adelante (Mastrorilli *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2020).

La localización plasmídica de los genes de resistencia a antibióticos del clon español fue demostrada inicialmente por nuestro grupo en los aislamientos del periodo 1997-1998 (Guerra *et*

al., 2001). Se comprobó, además, la presencia de los genes de virulencia *spv* (ver apartado 4.1.3.1.3) en el plásmido pUO-STmRV1 de LSP 389/97 pero no en la variante pUO-STmR1 de LSP 272/98. Estudios posteriores identificaron los replicones IncA/C (posteriormente renombrado como IncC) o IncA/C junto con IncN en los plásmidos del clon español (García *et al.*, 2011). Ambos replicones están presentes en pUO-STmRV1 y pUO-STmR1, pertenecientes a los aislamientos más antiguos, pero solo en 7 de los 19 aislamientos correspondientes al periodo 2002-2003 (36,8%). Curiosamente, todos los aislamientos posteriores analizados en este trabajo fueron positivos para el replicón IncC, pero ninguno de ellos portó el replicón IncN. Los plásmidos IncC se han encontrado en numerosas bacterias patógenas, donde actúan como vehículos de genes de resistencia a antibióticos tanto de uso tradicional como de más reciente introducción en medicina humana. Aparentemente, estos genes fueron adquiridos múltiples veces a lo largo del proceso evolutivo, normalmente como parte de elementos genéticos móviles que se han insertado en regiones concretas del esqueleto (“backbone”) del plásmido (Ambrose *et al.*, 2018).

pUO-STmRV1, fue analizado detalladamente en este trabajo, gracias a su secuenciación con la plataforma SMRT-PacBio, como parte del genoma de LSP 389/97. Se trata de un plásmido con un “backbone” altamente degenerado, considerablemente más pequeño que el de otros plásmidos IncC: 60.875 pb en comparación con 127,8 kb y 129,2 kb descritos para los plásmidos tipo 1 y tipo 2, respectivamente (Ambrose *et al.*, 2018). El ADN exógeno incorporado por el “backbone” representa más de 2/3 del genoma del plásmido. Gran parte de este ADN deriva de plásmidos pertenecientes a otros grupos de incompatibilidad, incluidos IncF (como R100 y pSLT), IncN e IncI. Una comparación de pUO-STmRV1 con estos plásmidos, y con pR148, incluido como representante del grupo IncC, se muestra en la Figura 46. Otras secuencias adquiridas por el backbone de pUO-STmRV1 proceden del elemento integrativo *GI_{sul2}* (Nigro and Hall, 2011) o son de origen desconocido.

La reducción del “backbone” de pUO-STmRV1 llevó a la pérdida de un gran número de genes implicados en conjugación, lo que impide su transferencia horizontal a otras bacterias. Aunque en condiciones de laboratorio el plásmido pudo ser transferido a *E. coli* mediante conjugación triparental (P. García, Tesis Doctoral), su dispersión en la naturaleza es esencialmente vertical, dentro del clon monofásico español. De acuerdo con ello, ningún plásmido de tipo pUO-STmRV1 se ha encontrado fuera del clon. De la misma manera, tampoco se detectaron aislamientos del clon carentes del plásmido. Esto último está de acuerdo con lo esperado, teniendo en cuenta que los plásmidos de gran tamaño, incluido el del clon español, son “entidades egoístas”, capaces de matar a las bacterias que los pierden asegurando así su mantenimiento y propagación. Esto se consigue gracias a sistemas toxina-antitoxina o de adicción plasmídica, que provocan la muerte post-segregacional de las células hijas que no hayan heredado

DISCUSIÓN

el plásmido o de cualquier célula que lo haya perdido. La actuación de estos sistemas radica en la síntesis constitutiva de una molécula estable que actúa como toxina y otra más lábil que actúa como antitoxina. Cuando el plásmido está presente, se producen ambas sustancias y la célula sobrevive. Por el contrario, si el plásmido se pierde o no se hereda, la antitoxina termina degradándose dejando que la toxina destruya a las bacterias que han quedado desprotegidas (Gerdes *et al.*, 2005). pUO-STmRV1 no solo contiene los genes *ant* y *tox* (denominados también *ata* y *tad*), que codifican el sistema toxina propio de plásmidos IncC (Hancock *et al.*, 2017). Además, como parte del ADN adquirido, consiguió dos sistemas adicionales, el *ccdAB* de pSLT y el *pemKI* de R100, lo que aumentaría aún más su estabilidad. Por otro lado, estos sistemas están implicados en una amplia variedad de funciones biológicas, incluyendo el control del crecimiento, la defensa frente a fagos y la formación de biofilm. Por ello, además de conseguir la estabilidad del plásmido, podrían contribuir al éxito de los aislamientos que los contienen, en términos de adaptabilidad a condiciones ambientales adversas (Hayes, 2003).

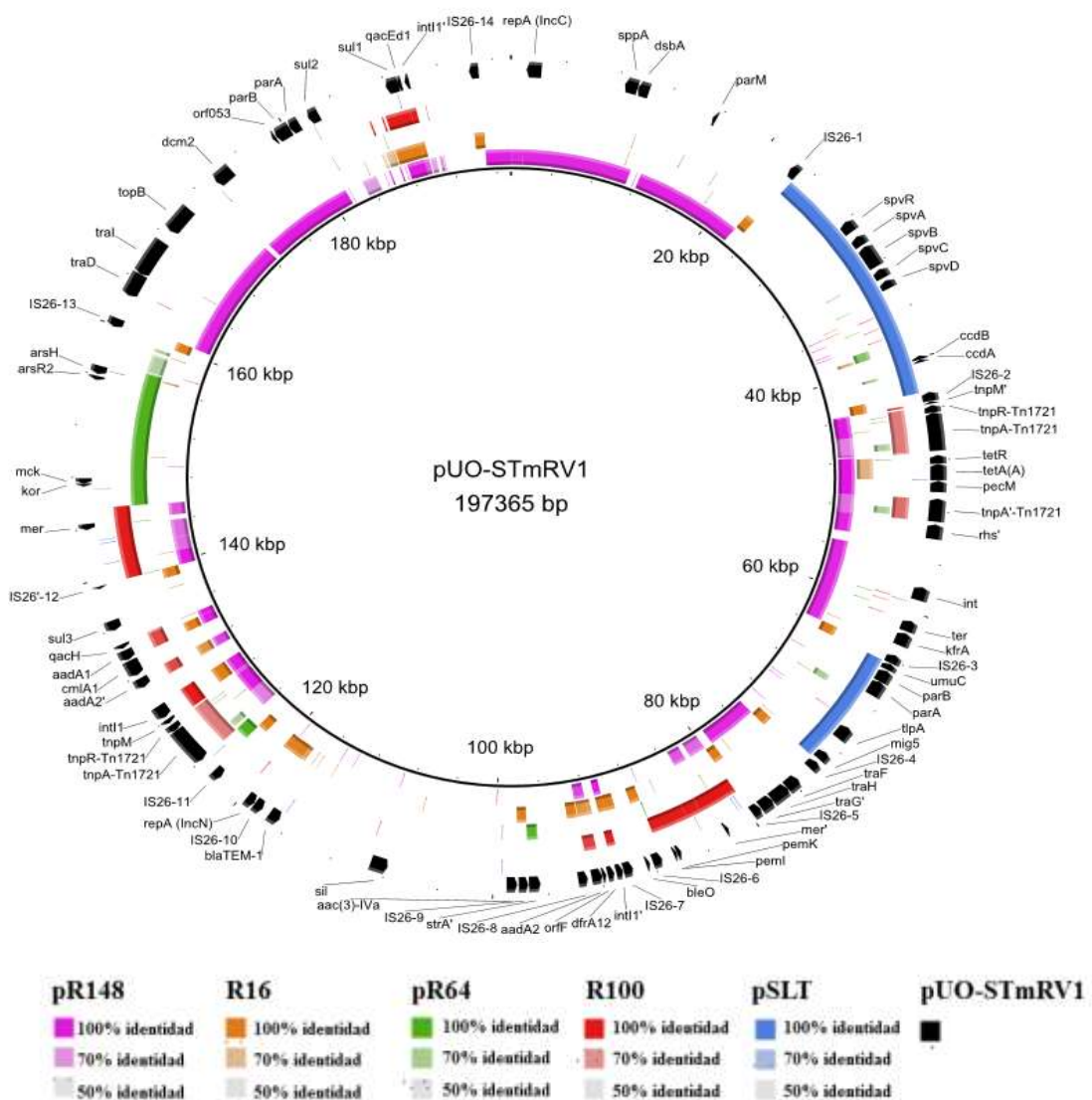


Figura 46. Comparación con BRIG (Blast Ring Image Generator) de pUO-STmRV1 con pR148 (n° de acceso JX141473; IncC), R46 (AY046276; IncN), pR64 (AP005147; IncI), R100 (AP000342; IncFII), y pSLT (el plásmido virulencia IncFII_s-IncFII_b específico de *Typhimurium*; AE006471). Cada uno de los anillos en posición intermedia corresponde a un plásmido, como se indica a en la parte inferior de la figura, junto con el código de colores que los identifica. El anillo interno, en negro, representa a pUO-STmRV1 que se utilizó como referencia. El anillo externo muestra los genes (representados con flechas negras que indican la dirección de transcripción) y las 14 copias of IS26 presentes en pUO-STmRV1.

En su origen, los aislamientos pertenecientes al clon español presentaron un fenotipo heptarresistente, que incluía resistencias a ampicilina, cloranfenicol, gentamicina/tobramicina, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim, codificadas por los genes *bla*_{TEM1-B}, *cmlA1*, *aac(3')-IV*, *aadA2*, [*sul1*, *sul2*, *sul3*], *tet(A)* y *dfrA12*, respectivamente (Echeita *et al.*, 1999, 2001; de la Torre *et al.*, 2003; Antunes *et al.*, 2011; García *et al.*, 2011, 2013). Cabe destacar que la resistencia a gentamicina, antibiótico de uso en medicina, es infrecuente en otros clones mayoritarios de *S. enterica*. De hecho, los plásmidos detectados en los primeros aislamientos del clon, LSP 389/97 y LSP 272/98, y en más del 50% (10/19) de los recuperados en el periodo 2002-2003, codificaban el fenotipo heptarresistente. Sin embargo, los restantes ya habían perdido una o dos resistencias del perfil mayoritario (Guerra *et al.*, 2001; García *et al.*, 2011). Esta tendencia se acentuó con el paso del tiempo, de modo que todos los aislamientos del clon español analizados en este trabajo, excepto uno (Tabla 12, LSP 148/18), mostraron un perfil reducido, con pérdida de hasta 5 resistencias respecto al original. La pérdida de resistencias más común fue a cloranfenicol y trimetoprim, ambas ausentes en 13 de los 16 aislamientos analizados. Por otro lado, también se detectaron deleciones de genes implicados en la resistencia a metales pesados, aunque en menor grado. La pérdida de resistencias, acentuada con el paso del tiempo, está directamente relacionada con la inestabilidad del plásmido donde se localizan los genes responsables. Dicha inestabilidad se debe a la actividad de IS26, presente en múltiples copias, y de otros muchos elementos genéticos potencialmente móviles (ISs y transposones), junto con sucesos de recombinación homóloga entre ADN repetido, incluyendo partes de integrones de clase 1, de la región *mer* de Tn21 y del transposón Tn1721. Todo ello contribuye a la elevada complejidad y plasticidad del plásmido, reflejada en las múltiples variantes encontradas tanto en este trabajo como en estudios previos (Guerra *et al.*, 2001; García *et al.*, 2011). De acuerdo con lo expuesto, pUO-STmRV1 constituye una plataforma estable, encargada de su propia perpetuación, aunque capaz de perder o adquirir ADN adicional que quedará sujeto al proceso de selección natural en condiciones ambientales cambiantes. De hecho, es necesario destacar que los aislamientos con fenotipo de resistencia reducido solo pudieron prosperar en ausencia de presión selectiva. Esta disminuyó a lo largo de los años, con la implantación de estrategias a nivel de la UE para la contención de la resistencia a los antibióticos (Commission implementing decision 2013/652/EU; European Commission, 2013).

pUO-STmRV1 comparte características propias de plásmidos IncC clasificados como de tipo 1 y de tipo 2, por lo que en principio se pensó que podría tratarse de un nuevo plásmido híbrido. Sin embargo, el análisis filogenético llevado a cabo en este trabajo (ver Figura 26) indica que el plásmido del clon español pertenece a un linaje antiguo, que se separó en una etapa temprana del proceso evolutivo de la rama principal de plásmidos IncC, donde se agrupan la inmensa mayoría de los descubiertos hasta el momento. Este antiguo linaje pudo haber evolucionado en una época en la que el uso incontrolado de antibióticos y biocidas, incluyendo metales pesados, propició la acumulación de múltiples genes de resistencia en una plataforma IncC, hecho facilitado por la acción de IS26 y otros muchos elementos genéticos móviles, a expensas de la reducción significativa del “backbone”. El plásmido resultante permitió al clon español adaptarse a una gran variedad de condiciones adversas, promoviendo a la vez su propio mantenimiento y propagación a través de la utilización de sistemas toxina-antitoxina y de su transmisión vertical dentro del clon.

En el segundo clon monofásico analizado en el presente trabajo, clon sud-europeo, la resistencia a antibióticos es aportada por plásmidos IncR. La mayoría (6/7) presentan la pentarresistencia frente a cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim, previamente asociada con este clon en aislamientos de España, Italia y Portugal (García *et al.*, 2014; Mourao *et al.*, 2014). Estas resistencias están codificadas por los genes *cmlA1*, [*aadA1*, *aadA2*, *aadA24*, *strA*, *strB*], [*sul2*, *sul3*], *tet(B)* y *dfrA12*, respectivamente. Muchos de estos genes (en concreto *cmlA1*, las variantes de *aadA*, *sul3* y *dfrA12*), se localizan en un integrón de clase 1 de tipo *sul3* (Mourao *et al.*, 2014). Un único aislamiento adquirió resistencia adicional a ampicilina, codificada por *bla*_{TEM-1B}, que aún no había sido descrita en este clon. Este aislamiento fue, además, el único sensible a tetraciclina. Al contrario que el plásmido del clon español, los plásmidos IncR del clon sud-europeo no han sido caracterizados en detalle. Sin embargo, diferencias en cuanto a tamaño (117 a 152 Kb, aproximadamente) y contenido en genes de resistencia a antibióticos sugieren también una elevada plasticidad. La variabilidad afecta además a genes de resistencia a plata/cobre, encontrados en 2 de los 7 plásmidos. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos del clon sud-europeo analizados en este trabajo, carecen de genes de resistencia a metales pesados (Tabla 22), lo cual coincide con lo observado previamente en aislamientos de Portugal (Mourao *et al.*, 2015). Esto podría explicar, al menos en parte, porqué el clon sud-europeo no alcanzó el grado de dispersión del español.

Por su parte, el clon europeo se asocia con la tetraresistencia a ampicilina, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina, siendo *bla*_{TEM-1B}, *strA*, *strB*, *sul2* y *tet(B)*, respectivamente, los genes implicados. La mayoría de los aislamientos del clon, tanto del PA como del País Vasco, analizados en este trabajo, incluyeron las cuatro resistencias del perfil característico (Tabla 25 y Tabla 29). Sin embargo, considerados en conjunto, los perfiles detectados fueron altamente heterogéneos. Al igual que en el clon español, algunos aislamientos

presentaron perfiles reducidos, por pérdida de una, dos o tres de las resistencias características. Sin embargo, a diferencia de los anteriores, los del clon europeo adquirieron resistencias adicionales no solo a otros antibióticos tradicionales, como cloranfenicol, aminoglicósidos y trimetoprim, sino también a antibióticos de gran relevancia en medicina, como cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas, fluoroquinolonas y colistina. Además, algunos aislamientos adquirieron mutaciones cromosómicas que confieren resistencia a quinolonas. Por otro lado, el clon europeo, al igual que el español, es también resistente a numerosos metales pesados, gracias a genes aportados por regiones RR (mercurio) y por SGI-4 (arsénico, plata y cobre). El uso de metales pesados, (particularmente cobre y zinc, pero también hierro, cobalto, manganeso y arsénico), como promotores del crecimiento animal a niveles sub-terapéuticos, y con fines profilácticos en ganadería porcina (Medardus *et al.*, 2014), pudo haber contribuido a la selección y dispersión del clon europeo (Petrovska *et al.*, 2016; Mastroilli *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2020). Esta práctica se vio incrementada a raíz de la prohibición en la UE del uso de antibióticos como promotores de crecimiento, que entró en vigor a partir de 2006 [Regulation 1831/2003/EC on additives for use in animal nutrition (1831/2003/EC, 2003)]. La utilización de metales en producción animal ha generado alarma en la comunidad científica, no solo debido a su contribución a la selección de clones resistentes, sino también a la posibilidad de co-selección de resistencia a antibióticos en las bacterias expuestas a ellos (Wales *et al.*, 2015).

Debido a la presencia de IS26, las regiones RRs del clon europeo presentan una gran diversidad, que afecta al módulo/módulos donde se localizan los genes de resistencia, a las regiones flanqueantes y, en su caso, al ADN que separa los módulos. En muchos casos, la diversidad se traduce en pérdida del locus *mer* o de alguno de los genes responsables del fenotipo tetrarresistencia y solo en un caso se adquirió un gen de adicional, en concreto *floR* de resistencia a cloranfenicol y florfenicol. Cabe destacar que se trata de la primera RR donde se describe ganancia de resistencia. A diferencia de estas regiones, SGI-4 se encuentra altamente conservada en el clon europeo. De hecho, fue 100% idéntica en todos los aislamientos secuenciados en este trabajo donde estuvo presente (90%; 27/30) (ver apartado 4.1.3.3) y coincidió también con muchas otras disponibles en bases de datos. SGI-4, que consta de 80.686 pb, se encuentra flanqueada por repeticiones directas de 55 pb, denominadas *attL* and *attR*, y contiene genes cuyos productos permiten su integración, escisión y transferencia por conjugación, al tratarse de un ICE. Entre los aislamientos previamente caracterizados, SGI-4 fue encontrada en más del 95% (74/77), frecuencia superior a la del presente trabajo (Petrovska *et al.*, 2016; Branchu *et al.*, 2019). La ausencia de SGI-4 se debe a su escisión del cromosoma por recombinación específica de sitio entre los sitios *att*. Esto regenera la región cromosómica intacta, tal como se encuentra en el genoma de *Typhimurium* LT2, que coincide exactamente con las de los aislamientos donde no se encontró la SGI-4 en el presente estudio.

En relación a la variabilidad detectada en el clon europeo, cabe destacar la adquisición por transferencia horizontal de plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad portadores de genes de resistencia a antibióticos de gran relevancia en medicina. Dichos plásmidos, pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncHI2, IncI1 e IncX4, encontrados tanto en aislamientos clínicos como de alimentos, aportan genes *bla*_{CTX-M-9} y *bla*_{CTX-M-14} (de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro), *qnrA1* (de resistencia plasmídica a fluoroquinolonas) y *mcr* (de resistencia plasmídica a colistina). Se detectó, además, el gen *bla*_{CMY-2} en el cromosoma de un aislamiento. Este gen codifica una β -lactamasa de tipo AmpC, que son activas frente a penicilinas, cefalosporinas (como cefotaxima), cefamicinas (como cefoxitina), oxyminocefalosporinas y monobactamas (como el aztreonam) (Jacoby, 2009). Todos estos antibióticos fueron categorizados por la OMS como de “importancia crítica y máxima prioridad en medicina humana” (WHO, 2016). Aislamientos clínicos con estas resistencias fueron encontrados en diferentes hospitales, tanto en el PA como en el País Vasco. En cuanto al PA, llama la atención la dispersión de aislamientos portadores de plásmidos IncHI2 de gran tamaño, donde se localizaron los genes *bla*_{CTX-M-9} y *mcr-9*, junto con otros genes de resistencia a antibióticos tradicionales. Dichos aislamientos fueron encontrados no solo en el HUCA y el HUC, como se describe en el presente trabajo, sino también en otros hospitales de la región: Hospital Valle del Nalón (Langreo), Hospital Carmen y Severo Ochoa (Cangas de Narcea) y Hospital de Jarrio (datos no presentados).

La detección de plásmidos transferibles (IncX4, IncHI2 o IncI-1(α)), portadores de genes de resistencia a colistina (*mcr-1.1*) o cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas (*bla*_{CMY-2}) en aislamientos del clon europeo recuperados de alimentos es de especial interés, ya que apoyan el papel de este clon como reservorio y posible agente de transmisión de importantes resistencias a lo largo de la cadena alimentaria. Los plásmidos IncX4 e IncHI2 se encuentran entre los vehículos más prevalentes que conducen a la propagación global de *mcr-1* en diferentes bacterias, incluido el clon monofásico europeo (Nang *et al.*, 2019). La evidencia disponible indica que el gen *mcr-1* se movilizó originalmente del cromosoma de una especie del género *Moraxella* mediante un transposón compuesto flanqueado por IS*Apl1* denominado Tn6330 (Poirel *et al.*, 2017; Snesrud *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de los entornos del gen *mcr-1* detectados carecen de una o, más frecuentemente, de ambas copias de IS*Apl1* (Snesrud *et al.*, 2016; Snesrud *et al.*, 2018). Ninguna de las dos copias de IS*Apl1* se encontró en el entorno de los genes *mcr-1.1* de los aislamientos caracterizados en el presente trabajo. Esto se considera como un mecanismo de estabilización del gen de resistencia y del mantenimiento de la integridad del plásmido (Snesrud *et al.*, 2018). Curiosamente, en los plásmidos IncX4 de tres de los aislamientos procedentes de alimentos se encuentra una copia de IS26, próxima al gen *mcr-1.1*. A diferencia de IS*Apl1*, IS26, una vez insertada en un plásmido o una localización cromosómica, es capaz de proliferar contribuyendo activamente a la generación de regiones de resistencia complejas que contienen

múltiples copias del elemento (Harmer and Hall, 2014; He *et al.*, 2015). Numerosos ejemplos de ello se encontraron en la presente Tesis Doctoral, al analizar no solo las variantes de la región RR del clon europeo, sino también el plásmido pUO-STmRV1 del clon español y las variantes de SGI1-K del serotipo Kentucky.

Finalmente, de especial relevancia es la adquisición de resistencia a fluoroquinolonas y piperacilina/tazobactam por parte de un aislamiento del clon europeo, inicialmente tetrarresistente. Las nuevas resistencias fueron seleccionadas *in vivo*, a raíz del tratamiento con ciprofloxacino y amoxicilina/clavulánico de un paciente ingresado por dos veces en el HUCA. Durante el primer ingreso, en la planta de nefrología del hospital, se aislaron bacterias tetrarresistentes perteneciente al clon europeo a partir de muestras de heces y sangre del paciente. Cuatro meses después, el paciente ingresó nuevamente en el HUCA, aquejado de problemas neurológicos. Durante esta segunda estancia contrajo una neumonía nosocomial, por la cual tuvo que ser trasladado a la UCI. La misma bacteria anterior, con resistencias adicionales a fluoroquinolonas y piperacilina/tazobactam, fue recuperada de heces, sangre y aspirado traqueal del paciente e identificada como el agente causal de la neumonía nosocomial. La resistencia a ciprofloxacino se debió a una mutación puntual en el gen cromosómico *gyrB*, que provocó la sustitución S464F en la proteína. Esta mutación había sido descrita previamente en un aislamiento clínico de Typhimurium, cuya susceptibilidad frente a ácido nalidíxico, esparfloxacino y ciprofloxacino disminuyó a raíz del tratamiento del paciente con este último compuesto (Gensberg *et al.*, 1995). Por otro lado, la resistencia a la combinación de un antibiótico β -lactámico con un inhibidor de β -lactamasas, se asocia a la superproducción de β -lactamasas. En los aislamientos del HUCA, el mecanismo de super-producción del gen *bla*_{TEM-1}, responsable de la resistencia a piperacilina/tazobactam, de momento se desconoce. De acuerdo con la información disponible, podría deberse a un incremento en la transcripción del gen o a un aumento en el número de copias (Lartigue *et al.*, 2002; Hubbard *et al.*, 2020).

Como se comentó anteriormente, las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas constituyen los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones severas causadas por *S. enterica* (Gilbert *et al.*, 2021). Por ello, la selección post-tratamiento de resistencia a fluoroquinolonas es preocupante. Por otro lado, aunque la combinación piperacilina/tazobactam no está recomendada para el tratamiento de infecciones por *S. enterica*, se trata sin embargo de los compuestos utilizados de manera empírica para combatir infecciones graves en UCI. Por ello, los individuos con infecciones graves causadas por bacterias resistentes a piperacilina/tazobactam no podrán responder al tratamiento empírico.

Cabe destacar que las infecciones del tracto respiratorio causadas por *S. enterica* son infrecuentes, aunque se han descrito algunos casos que afectaron principalmente a pacientes inmunocomprometidos. La mayoría de los descritos se debieron al serotipo Typhi, altamente

invasivo, así como a los dos serotipos no-tifoideos más frecuentes: Enteritidis, incluyendo una variante invasiva endémica en África, y Typhimurium (Casado *et al.*, 1997; Eaton *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2013; Knight *et al.*, 2000; Saeed, 2016; Bastin *et al.*, 2016). Sin embargo, esta es la primera descripción de un caso de neumonía debido al clon monofásico europeo. En resumen, el caso clínico de neumonía nosocomial presentado en esta Tesis Doctoral representa un paradigma de como la presión selectiva, asociada al tratamiento con antibióticos, puede conducir a la aparición de bacterias resistentes, lo cual repercutiría muy negativamente sobre la recuperación de los pacientes.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de los aislamientos monofásicos de los clones español, sud-europeo y europeo, se determinó *in silico* el contenido en genes de virulencia y elementos genéticos asociados. Todos los aislamientos analizados presentaron perfiles de virulencia homogéneos en cuanto al contenido en SPIs, islotes de patogenicidad y fimbrias. Este resultado coincide lo previamente descrito para la variante monofásica y también con la observación de que los aislamientos pertenecientes al mismo serotipo suelen ser homogéneos en cuanto a perfil de virulencia (Hauser *et al.*, 2010; P. García, Tesis Doctoral; Huehn *et al.*, 2010). De hecho, los perfiles de la variante monofásica coinciden con los del serotipo Typhimurium del cual procede. Las únicas diferencias encontradas afectaron al contenido en profagos y a genes procedentes de pSLT, presentes en todos los aislamientos del clon español, excepto 2, y en todos los de clon sud-europeo. Sin embargo, no se encontraron en los pertenecientes al clon europeo. La ausencia de pSLT en estos aislamientos, ya destacada por otros autores, fue confirmada en este trabajo mediante análisis bioinformático de los genomas secuenciados.

En el género *Salmonella* la redundancia y diversidad de fimbrias es frecuente (Edwards *et al.*, 2002) y los operones que las codifican se encuentran relativamente conservadas dentro del mismo serotipo (Porwollik *et al.*, 2004). En todos los aislamientos monofásicos analizados se detectaron los mismos operones, que se corresponden con los previamente descritos para Typhimurium (*bcf*, *csg*, *fim*, *saf*, *stb*, *stc*, *std*, *sth*, todos ellos comunes con el serotipo Typhi) y cinco operones específicos de Typhimurium (*lpf*, *stf*, *pef*, *sti* y *stj*) (McClelland *et al.*, 2011; Sabbagh *et al.*, 2010). Previamente se habían descrito en la cepa de referencia Typhimurium LT2 pseudogenes pertenecientes a 6 operones fimbriales de la cepa Typhi CT18, incluyendo el gen *steA* (Townsend *et al.*, 2001). Además, en todos los aislamientos analizados en este trabajo se identificaron otros dos genes adicionales pertenecientes al operon *ste*. El repertorio de fimbrias, con diferente especificidad de unión a receptores de células eucarióticas, podría explicar, al menos en parte, el amplio rango de hospedador de la variante monofásica.

En cuanto a los genes implicados en la biosíntesis de los flagelos, todos los aislamientos analizados presentaron deleciones que afectan a la región *fljAB*, responsable de su carácter monofásico (Garaizar *et al.*, 2002; Zamperini *et al.*, 2007; Soyer *et al.*, 2009; Hauser *et al.*, 2010;

Hopkins *et al.*, 2010, 2012; Laorden *et al.*, 2010; Ido *et al.*, 2011; Lucarelli *et al.*, 2012; Bugarel *et al.*, 2012; García *et al.*, 2013, 2016). Estas pueden provocar la pérdida del antígeno flagelar de segunda fase mediante la delección parcial o total de los genes *fljA*, *fljB* y/o *hin*, abarcando incluso un gran número de genes adyacentes. Previamente, se describieron cinco regiones cromosómicas presentes en el genoma de la cepa de *Tyhimurium* bifásica LT2 que no se encuentran en los aislamientos U302 y otros fagotipos asociados con aislamientos pertenecientes al clon español (Garaizar *et al.*, 2002; García *et al.*, 2013). Estas regiones fueron designadas como clúster I a clúster V, e incluyen: parte del operón metabólico alantoína-glioxilato (STM0517-0519; clúster D), genes asociados a los profagos Fels-1, Gifsy-1 y Fels-2 (clústeres II, III y IV), y el operón *fljAB* y genes adyacentes (STM2757-*iroB*; clúster V). De forma global, se puede hablar de tres patrones mayoritarios de delecciones asociadas a los clones americano, español y sud-europeo. Los aislamientos del clon americano presentan una delección que afecta a una amplia región que incluye 77 genes, desde STM2693 a STM2771 (clúster IV y clúster V, junto con la región intermedia), pero con la conservación del gen *hin* en el extremo 3' (Soyer *et al.*, 2009). Por otro lado, se han descrito dos patrones de delección diferentes que afectan a los aislamientos del clon español, causadas en ambos casos por la inserción de una copia de IS26 que afecta a los genes STM2757-*iroB* (Garaizar *et al.*, 2002; Laorden *et al.*, 2010; García *et al.*, 2011). La mayoría de los aislamientos del clon español analizados en este trabajo presentaron una de esas dos delecciones, que también había sido encontrada en aislamientos del PA (García *et al.*, 2011). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral se detectó un nuevo tipo de delección no descrito anteriormente (Figura 22). En el caso de los aislamientos del clon sud-europeo se identificó una delección idéntica a la previamente encontrada en el clon americano, y también en otros aislamientos del clon sud-europeo procedentes de España y Portugal (Mourao *et al.*, 2014; Arrieta-Gisasola *et al.*, 2021). Esta delección se caracteriza por afectar a la región comprendida entre STM2692 y STM2772 y contiene una región de 7 Kb integrada por dos genes parciales del profago Fels-2 (STM2704 y STM2706) y tres genes homólogos a STM1054, STM1053 y STM1997, los cuales codifican dos genes del profago Gifsy-2 y un componente de la ADN polimerasa V (*umuC*), respectivamente (Soyer *et al.*, 2009). Sin embargo, tres de los siete aislamientos analizados en este trabajo presentaron un nuevo patrón, donde el gen *hin* se encuentra invertido (Figura 27). La coincidencia de la delección más frecuente del clon sud-europeo con la encontrada en el clon americano, llevó a proponer que el primero habría evolucionado a partir del segundo por adquisición de un plásmido IncR, presente en el metagenoma europeo, que fue seleccionado ante a la presión selectiva ejercida por la presencia de antibióticos (Mourao *et al.*, 2014). Por último, los aislamientos del clon europeo carecen normalmente de los genes *fljA*, *fljB* y *hin* (Hauser *et al.*, 2010; Hopkins *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2012; García *et al.*, 2016), aunque el gen *hin* se mantuvo en un aislamiento procedente de alimentos caracterizado en este trabajo. En este clon se

ha descrito la presencia de una copia de IS26 en el lugar del operón *fljAB*, apoyando la teoría de que la secuencia de inserción IS26 reconoce un punto caliente (“hotspot”) en la región del cromosoma correspondiente al antígeno flagelar de segunda fase (Lucarelli *et al.*, 2012; García *et al.*, 2016). Además, esta región tiene un contenido GC mucho más bajo que el genoma *core* de *Salmonella* (45 y 52,2%, respectivamente), lo que sugiere que esto podría propiciar la integración de ADN exógeno (García *et al.*, 2016). Sin embargo, en todos los aislamientos del clon europeo caracterizados en este trabajo, así como en la mayoría de los descritos previamente en la literatura, la delección de los genes *fljA*, *fljB* (y *hin*) se asocia a la inserción, en una o varias etapas, de la región RR. Esta región se encuentra flanqueada por IS26 conteniendo, además, copias internas de la misma.

Los flagelos constituyen estructuras fuertemente inmunogénicas capaces de desencadenar la respuesta inmune del hospedador y por ello, la capacidad de sintetizar dos tipos alternativos de flagelina aportaría una ventaja al permitir a los serotipos bifásicos evadir la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, ciertos serotipos monofásicos, incluida la variante monofásica de Typhimurium y también Typhi, no parecen verse afectados por la pérdida de esta capacidad. Dado que la virulencia en *S. enterica* es multifactorial, otros factores de virulencia podrían compensar el fenotipo monofásico.

Al igual que la mayoría de los miembros del género *Salmonella*, los aislamientos monofásicos presentaron las islas SPI-1 a SPI-6. Se detectaron, además, las islas SPI-9, SPI-10 y SPI-24, características de la subespecie I, las islas SPI-13 y SPI-14 descritas en los serotipos Gallinarum y Typhimurium y las islas SPI-11 y SPI-12 detectadas en Choleraesuis. Typhimurium LT2 y Typhi comparten 11 SPIs (SPI-1 a 6, 9, 11, 12, 13 y 16), mientras que SPI7, SPI-8 y SPI10 se encontraron únicamente en Typhi (Sabbagh *et al.*, 2010). Cabe destacar que en todos los aislamientos analizados se identificaron muchos otros genes de virulencia, que se presentan de manera asilada o localizados en islotes cromosómicos y/o plasmídicos.

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes de la tierra, participando activamente en la remodelación constante de las comunidades bacterianas (Suttle, 2007; Brussaard *et al.*, 2008). Además, son impulsores esenciales de la evolución de los genomas de las células que parasitan. Esto se debe a la existencia de fagos lisogénicos o temperados, cuyo genoma puede integrarse en el de la bacteria que parasitan, quedando como profagos inactivos (Roux *et al.*, 2015a; 2015b; Casjens and Grose, 2016). Los profagos se transmiten verticalmente durante la división celular bacteriana y puede inducirse en situaciones de estrés, como las resultantes de daños en el ADN o durante el proceso de infección (Kim *et al.*, 2014). Además de profagos completos, los genomas de *S. enterica* contienen profagos defectivos que no pueden dar lugar a partículas infecciosas, pero si pueden mantenerse en el cromosoma de la célula hospedadora (Casjens, 2003; Bobay *et al.*, 2013).

En este trabajo se detectó un número elevado de profagos, siendo estos la principal fuente de variabilidad intra- e inter-clon. Los profagos pueden aportar genes que modifican las características de las bacterias en cuyo genoma se integran. Así, los tres clones monofásicos se detectaron los genes de virulencia *sodCI*, *gvrA*, *sfrH* y *sseI* de origen profágico. Además, el clon europeo adquirió el gen de virulencia *sopE* por transferencia horizontal del bacteriófago temperado mTmV (“monophasic Salmonella Typhimurium V”) o variantes del mismo, que no están incluidos en la base de datos de PHASTER (Petrowska *et al.*, 2016; Palma *et al.*, 2018; Elnekave *et al.*, 2018). Este gen codifica un factor GEF (“Guanine nucleotide Exchange Factor”) que activa GTPasas de la familia Rho (Cdc42 y Rac-1) en células del hospedador, induciendo cambios en la membrana que permiten la entrada de *S. enterica*, y que además promueven la respuesta inflamatoria en el intestino, contribuyendo a los síntomas diarreicos (Wood *et al.*, 1996; Hardt *et al.*, 1998; Trüpschuch *et al.*, 2010). El gen *sopE* no estaba presente en el antecesor bifásico ST34 del clon europeo y su adquisición, que ocurrió varias veces de manera independiente (al menos 6), fue acompañada de la expansión clonal de los aislamientos que lo adquirieron (Tassinari *et al.*, 2020). En este trabajo, aparte de los genes *spv*, *sopE* fue el único gen de virulencia diferencial detectado en la amplia colección de aislamientos monofásicos caracterizados. En concreto, no apareció en ningún aislamiento de los clones español y sud-europeo, pero sí en el 66,6% (20 de 30) de los secuenciados pertenecientes al clon europeo. Todos los aislamientos positivos para *sopE*, excepto dos, se distribuyen en tres sub-grupos claramente definidos, de acuerdo con la adquisición del gen en más de una ocasión (Figura 34).

5.2. Otros serotipos de *S. enterica*

En esta Tesis Doctoral se caracterizaron, por combinación de trabajo experimental y análisis genómico, al igual que en el caso de la variante monofásica, varios aislamientos pertenecientes a otros serotipos de *S. enterica*. Estos aislamientos fueron seleccionados por presentar resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, sin (genes *bla*_{CTX-M}) o con resistencia a cefamicinas (gen *bla*_{CMY-2}), fluorquinolonas y/o colistina. Como se comentó anteriormente, las cefalosporinas de amplio espectro y las fluoroquinolonas, se utilizan como tratamiento de elección en pacientes con infecciones invasivas causadas por *Salmonella*, mientras que la colistina es un antibiótico de último recurso para combatir infecciones graves originadas por bacterias MDR Gram negativas en hospitales (Sjölund- Karlsson *et al.*, 2011). Los aislamientos se detectaron en hospitales del PA, de Cantabria y del País Vasco, y se asignaron a los serotipos Kentucky (13), Typhimurium (4), Infantis (2), Bredeney (2), Courvallis (2), Enteritidis (1), Paratyphi B (1) y Kedougou (1). Destaca el bajo número de aislamientos con resistencias de gran relevancia en medicina, encontrados en los hospitales incluidos en el estudio. En general, estos resultados están de acuerdo con la información disponible para la UE, donde se observa que la resistencia a cefalosporinas de

amplio espectro en aislamientos clínicos de *S. enterica* se mantiene baja (1.5% y 1.2% en el caso de cefotaxima y ceftazidima, respectivamente, siendo estos los antibióticos seleccionados como indicadores). Lo mismo ocurre en *S. enterica* procedente de animales y alimentos (EFSA and ECDC, 2020). Sin embargo, la proporción de aislamientos de origen humano resistentes a ciprofloxacino, una fluoroquinolona de segunda generación (2a) (Pham et al., 2019), tuvo un promedio del 12.5%, alcanzando valores extremadamente altos en determinados serotipos, particularmente Kentucky (85.7%). En este serotipo, la resistencia a ampicilina, sulfonamidas, tetraciclina (frecuentes también en otros serotipos) y gentamicina (poco frecuente en *S. enterica*) fue también muy elevada, de modo que la mayoría de los aislamientos fueron MDR (EFSA and ECDC, 2020). Como se comentó en la introducción, la elevada resistencia de Kentucky se debe a la dispersión de un clon con secuencia tipo ST198, que surgió en Egipto, a raíz de la adquisición de una variante de SGI-1, denominada SGI1-K, que confiere resistencia a múltiples antibióticos (ampicilina, estreptomina, gentamicina, sulfonamidas y tetraciclina) (Le Hello et al., 2013b; Hawkey et al., 2019). El prototipo de SGI1-K, de 48.7 Kb, comprende un “backbone” de 27 kb y una región de resistencia compleja que consta de un integrón de tipo *In4*, partes de los transposones *Tn21*, *Tn1721*, *Tn5393* y *Tn2* transposons, and dos copias de *IS26*, en orientación opuesta, que flanquean al *Tn2* defectivo (Hamidian et al., 2015). SGI1-K se insertó en el cromosoma de *S. Kentucky* entre los genes *trmE* (*thdF*) y *yidY*, estando la región de resistencia delimitada por *resG* and $\Delta S044$, pertenecientes al “backbone” de la isla (Hamidian et al., 2015). Se han descrito múltiples variantes de SGI1-K, incluyendo dos altamente degeneradas, denominadas SGI1-P, que solo confiere resistencia a ampicilina, y SGI1-Q, que carece de genes de resistencia (Doublet et al., 2008; Le Hello et al., 2011; Hawkey et al., 2019).

Una vez adquirida SGI1-K, el clon ST198 MDR acumuló mutaciones en las QRDRs de los genes *gyrA* y *parC* que codifican subunidades de los enzimas ADN girasa y ADN topoisomerasa IV, respectivamente (Le Hello et al., 2013a). La sustitución Ser83Phe en *GyrA*, que por sí misma confiere resistencia a ácido nalidíxico, fue la primera que ocurrió (Hamidian et al., 2015), seguida después de la sustitución Ser80Ile en *ParC* que, combinada con la anterior, aumentó la CMI del ciprofloxacino. Sin embargo, el alto nivel de resistencia dependió de la aparición de una de varias mutaciones adicionales en *gyrA*, que afectan al aminoácido 87 de la proteína. Este hecho condujo a la expansión clonal de Kentucky ST198-Cip^R, y su posterior dispersión fuera de Egipto, alcanzando muchas otras regiones geográficas, incluida Europa (Le Hello et al., 2011; Hawkey et al., 2019). Una segunda mutación detectada en el gen *parC* (Thr57Ser) de Kentucky ST198 no parece estar asociada a resistencia a quinolonas, ya que también se encontró en aislamientos sensibles a ácido nalidíxico (Weill et al., 2006). Los cambios en las dianas de actuación de las quinolonas/fluoroquinolonas constituyen la principal causa de resistencia a estos compuestos. Sin embargo, en Kentucky, también se comprobó la participación de la bomba de expulsión AcrAB-

TolC y de mutaciones en el gen *rpoB* que codifica la subunidad β del enzima ARN polimerasa (Weill *et al.*, 2006; Baucheron *et al.*, 2013; Brandis *et al.*, 2021).

Dada la importancia del clon Kentucky ST198-Cip^R, en este trabajo, los 13 aislamientos de Kentucky resistentes a ciprofloxacino, encontrados en distintos hospitales del norte de España, fueron caracterizados en profundidad. Todos ellos se asignaron a ST198 y portaron estructuras similares a SGI1-K o SGI1-P. Cinco pacientes positivos para estos aislamientos habían viajado a un país africano antes de manifestar la enfermedad, mientras que otro pudo haberla adquirido en Indonesia, en concreto en Bali. Según ya se indicó, la relación entre Kentucky ST198-Cip^R y África está totalmente demostrada. El clon surgió en Egipto, desde donde se primero diseminó a otros lugares de África y después a Asia y a la Unión Europea (Le Hello *et al.*, 2011, 2012; Hawkey *et al.*, 2019). Con respecto a Indonesia, se detectaron dos aislamientos Cip^R, no relacionados epidemiológicamente, en pacientes franceses que habían viajado a ese país a principios de la década de los 90 (Le Hello *et al.*, 2012). Curiosamente, estos aislamientos no pertenecían al perfil PFGE-X1, asociado con los aislamientos africanos, sino a un perfil diferente (PFGE-X2). Además, contenían las islas SGI1-J4 y SGI1-J6 en lugar de las estructuras de tipo SGI1-K identificadas en el clon epidémico africano (Le Hello *et al.*, 2012). Sin embargo, aislamientos ST198-Cip^R de Kentucky con perfil PFGE-X1 y SGI1-K se encontraron posteriormente en Indonesia (Le Hello *et al.*, 2013a; Le Hello *et al.*, 2013). Aunque en este trabajo, los aislamientos de Kentucky no se tipificaron mediante PFGE, el aislamiento obtenido del paciente que había viajado a Indonesia fue el único que presentó la SGI1-K prototipo, por lo que probablemente pertenece al clon africano. Curiosamente, cuatro pacientes no informaron de viajes a un país extranjero antes del inicio de la enfermedad, lo cual está de acuerdo con una propagación intra-nacional del clon ST198-Cip^R en España.

La presencia de la SGI1-K se detectó por primera vez en la cepa del serotipo Kentucky SRC73, aislada en 2001 a partir de especias importadas a Australia desde la India y, desde entonces, se han detectado múltiples variantes (Levings *et al.*, 2007; Doublet *et al.*, 2008; Le Hello *et al.*, 2011; Hawkey *et al.*, 2019). Cada uno de los aislamientos analizados en esta Tesis Doctoral presentó una variante de SGI1-K diferente. La mayoría, si no todas estas variantes, podrían haber sido generadas por la actividad de IS26, una secuencia de inserción que está jugando un papel clave en la evolución de regiones de resistencia complejas, como SGI1-K, y también las regiones RR del clon europeo o las del plásmido pUO-STMRV1 del clon español. Como se comentó anteriormente (ver apartado 1.5.4.2.2), IS26 puede actuar mediante dos mecanismos de movimiento: (i) el mecanismo de “copy-in”, que requiere la replicación del ADN y conduce a la duplicación tanto de IS26 como de 8 pb presente originalmente en un sitio de inserción, dando lugar a DRs; y (ii) un mecanismo conservador en el que intervienen dos copias de IS26, donde la secuencia de inserción no se duplica y tampoco se generan DRs (Harmer *et al.*, 2014, 2020; He

et al., 2015). En las SGI1-K de Kentucky caracterizadas en el presente trabajo, el número de copias de IS26 varió entre uno y 4, apareciendo insertadas en diferentes (Figura 42). Cabe señalar que, del total de IS26 detectadas en estas regiones, solo tres de ellas se encuentran flanqueadas por duplicaciones directas, derivadas de la inserción aleatoria de IS26 en genes concretos: *mpA* de *Tn1721* en las variantes SGI1-K de dos aislamientos y *orfS025* perteneciente a la SGI1-P de un aislamiento; aunque en este caso se ha modificado la posición y orientación de una de las duplicaciones a consecuencia de una inversión. Las estructuras observadas pueden deberse a procesos de transposición inter- e intramolecular, respectivamente. La transposición intramolecular también pudo ser responsable de la generación de otras inversiones y de diferentes deleciones observado en las regiones analizadas (He *et al.*, 2015), mientras que la recombinación homóloga entre dos copias de IS26 en orientación opuesta pudo provocar la inversión del gen *bla_{TEM-1}* en otra variante.

El clon Kentucky ST198-Cip^R está evolucionando continuamente, no solo alterando las estructuras tipo SGI1-K y SGI1-P, afectando generalmente al contenido en genes de resistencia, sino también a través de adquisición de plásmidos, algunos de los cuales codifican resistencia a cefalosporinas de amplio espectro e incluso carbapenémicos (Hawkey *et al.*, 2019). En la mayoría de los aislamientos (69,2%) del presente estudio se detectaron plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad ColE, Col156, ColpVC, IncII o con replicones no identificados. Sin embargo, ninguno de ellos confirió a las bacterias portadoras resistencia o alguna otra propiedad beneficiosa detectable. En el serotipo Heidelberg, patógeno asociado a aves de corral, al igual que Kentucky ST198-Cip^R (Foley *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2017), se demostró que los plásmidos ColE1 o ColpVC aumentan la eficacia biológica de las bacterias en las condiciones ambientales del gallinero (Oladeinde *et al.*, 2018). Lo mismo podría ser cierto para los aislamientos de Kentucky portadores de esos plásmidos.

Un análisis filogenómico global de aislamientos de Kentucky ST198 reveló que todos los resistentes a ciprofloxacino portadores de SGI1-K o alguna de sus variantes pertenecen a un clado mono-filético (Hawkey *et al.*, 2019). Los 13 aislamientos ST198-Cip^R procedentes de hospitales del norte de España, cada uno de ellos portador de una variante distinta de SGI1-K o SGI1-P, pertenecen probablemente al clon africano. De acuerdo con ello, el análisis filogenético llevado a cabo en este trabajo (Figura 43) reveló que se encuentran estrechamente relacionados. Curiosamente, los dos aislamientos más cercanos, que solo se diferenciaron en dos SNP y que presentan variantes muy próximas, pero no idénticas de SGI1-P, se detectaron en hospitales localizados en diferentes comunidades de España, PA y País Vasco. Así, una vez que llegó a España, el clon Kentucky ST198-Cip^R se puede estar dispersando dentro del país, a la vez que sus islas genómicas continúan evolucionando, principalmente debido a la actividad de IS26.

A diferencia de Kentucky, los aislamientos pertenecientes a otros serotipos de *S. enterica* presentaron resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas, colistina, además de susceptibilidad reducida a fluoroquinolonas. Esta última solo se detectó en dos aislamientos de Corvallis ST1541, portadores del gen *qnrS1* en un plásmido ColE, mientras la resistencia a colistina se asoció a otros dos aislamientos, uno de Typhimurium ST34 (ver más adelante) y otro de Kedougou ST1543, donde se detectaron los genes *mcr-1* y *mcr-4*, en plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncX4 y ColE10, respectivamente.

Por otro lado, como ya se comentó anteriormente, destaca la detección de genes *bla*_{CTX-M} en aislamientos bifásicos del serotipo Typhimurium. En concreto, el gen *bla*_{CTX-M-14} en un aislamiento ST19 de Typhimurium y los genes *bla*_{CTX-M-9} o *bla*_{CTX-M-14} en 3 aislamientos ST34 del mismo serotipo. Estos genes se localizaron en plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad, IncF en el aislamiento ST19 e IncI (*bla*_{CTX-M-14}) o IncHI2 (*bla*_{CTX-M-9}) en los aislamientos ST34. Como se comentó anteriormente, existen evidencias de que el clon monofásico europeo deriva de aislamientos bifásicos ST34. En este sentido, es interesante destacar que plásmidos de los mismos grupos de incompatibilidad, portadores de los mismos genes, fueron detectados en aislamientos bifásicos y monofásicos en el presente trabajo. Es por tanto posible que, al menos en algunos casos, un aislamiento bifásico haya adquirido el plásmido antes de transformarse en monofásico por acción de IS26 en conjunción o no con RR. Cabe destacar, además, que el bifásico de Typhimurium que lleva el plásmido IncH2 portador del gen *bla*_{CTX-M-9}, contiene también un plásmido del grupo de incompatibilidad IncX4 donde se localiza el gen *mcr-1.1* de resistencia a colistina.

A diferencia de Typhimurium y su variante monofásica, donde la MDR no solo es frecuente, sino que también puede ir acompañada por resistencias adicionales frente a antibióticos de gran relevancia clínica, el serotipo Enteritidis es mayoritariamente sensible. En este trabajo, a pesar de su elevada incidencia, únicamente se detectó un aislamiento resistente cefalosporinas de amplio espectro, portador de un plásmido IncI con el gen *bla*_{CTX-M-14}. Este aislamiento solo mostró resistencia adicional a ácido nalidíxico, debida a una mutación en el gen cromosómico *gyrA* (con cambio D87Y en la proteína). Tampoco fue MDR el único aislamiento de Paratyphi B caracterizado en este trabajo que solo presentó resistencia a cefalosporinas de amplio espectro mediada, al igual que en Enteritidis, por el gen *bla*_{CTX-M-14} localizado en un plásmido IncI.

En cuanto a los demás serotipos, destacan dos aislamientos de Infantis ST32 que, al igual que los de Kentucky, pertenecen a un clon emergente ampliamente distribuido a nivel mundial. El éxito de este clon se atribuye a la adquisición, por transferencia horizontal, de un megaplásmido (en torno a 300 Kb) conjugativo, del grupo de incompatibilidad IncP, que aporta a las bacterias funciones de resistencia, virulencia y “fitness”. Este plásmido se detectó por primera vez en Israel, en 2014, y se denominó pES1 (Aviv *et al.*, 2014). Posteriormente, se encontraron plásmidos

similares en Italia, Suiza y USA (Franco *et al.*, 2015; Hindermann *et al.*, 2017; Tate *et al.*, 2017) y, en el presente trabajo, en dos aislamientos clínicos obtenidos en un hospital de Cantabria. El plásmido de estos aislamientos contiene múltiples genes de resistencia a antibióticos, incluyendo el gen *aac(3)-IV* de resistencia a gentamicina (que, como se comentó al hablar del clon español, es infrecuente en *S. enterica*) y *bla_{CTX-M-65}* de resistencia a cefalosporinas de amplio espectro.

La detección en hospitales del norte de España de aislamientos de distintos serotipos con resistencias emergentes, nos llevó a determinar el fenotipo de resistencia de todos los aislamientos de esos mismos serotipos encontrados en el PA durante el periodo 2008-2018 (datos no mostrados). En el caso de Infantis, un aislamiento presentó el fenotipo correspondiente al clon portador del plásmido pSE1 y otros muchos fueron resistentes a antibióticos tradicionales. Ningún otro serotipo presentó resistencias emergentes. Estos resultados apoyan su baja incidencia en el PA, al igual que a nivel europeo.

Los aislamientos de *S. enterica* resistentes a cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas, ciprofloxacino, fluoroquinolonas y colistina, como los descritos en este trabajo, se incluyen en la lista de bacterias resistentes con alta prioridad elaborada por la OMS (Tacconelli *et al.*, 2018). Por ello, aunque su incidencia en el PA y otras comunidades del Norte de España no fue muy elevada, se requiere una vigilancia constante para frenar su expansión.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. A thin pink line runs diagonally from the top left towards the bottom right, passing through the circles. Another thin pink line runs diagonally from the top right towards the bottom left, also passing through the circles. The circles are arranged in a descending staircase pattern from top to bottom.

CONCLUSIONES

“La evidencia es la más decisiva demostración”
(Cicerón)

1. En el Principado de Asturias, al igual que en la Unión Europea, la incidencia de *S. enterica* tanto en muestras clínicas como en alimentos, disminuyó considerablemente en los últimos años.
2. En países de la Unión Europea, incluida España, los serotipos de *S. enterica* más frecuentemente implicados en infecciones humanas son Enteritidis, Typhimurium y la variante monofásica de Typhimurium, por este orden. Sin embargo, en el Principado de Asturias la variante monofásica superó a Typhimurium a partir de 2012 y a Enteritidis a partir de 2018, situándose por tanto en el primer lugar.
3. La mayoría de las infecciones causadas por la variante monofásica en el Principado de Asturias se deben al clon europeo. Destaca la elevada incidencia del fagotipo DT138 raramente descrito en este clon.
4. Junto con la resistencia a antibióticos, la resistencia a metales pesados pudo haber contribuido al éxito alcanzado por los clones español y europeo de la variante monofásica. Por otro lado, la menor resistencia a metales pesados en el clon sud-europeo, podría justificar, al menos en parte, su menor dispersión.
5. El plásmido del clon español pertenece a un antiguo linaje de plásmidos IncC, que pudo haber evolucionado en una época en la que el uso incontrolado de antibióticos y biocidas, incluyendo metales pesados, propició la acumulación de genes de resistencia y virulencia, a expensas de la reducción significativa del esqueleto del plásmido.
6. La disminución en la presión selectiva, propiciada en parte por el control del uso de antibióticos en ganadería, permitió la pérdida de genes de resistencia del plásmido del clon español, hecho que se acentuó a lo largo del tiempo. La pérdida de la ventaja adaptativa pudo contribuir al declive del clon.
7. La adquisición de diversos plásmidos por transferencia horizontal es un hecho clave en la evolución del clon europeo, que confirió resistencia a antibióticos categorizados por la Organización Mundial de la Salud como de “importancia crítica y máxima prioridad en medicina humana”, en concreto cefalosporinas de amplio espectro, cefamicinas, fluoroquinolonas y colistina.
8. La adquisición post-tratamiento de genes de resistencia a fluoroquinolonas y piperacilina/tazobactam por parte del clon europeo, representa un paradigma de como la presión selectiva puede conducir a la aparición de nuevas bacterias resistentes, dificultando el control de las infecciones que originan. La resistencia a piperacilina/tazobactam es particularmente problemática, ya que esta combinación de fármacos se utiliza para el tratamiento empírico de pacientes con infecciones invasivas ingresados en unidades de cuidados intensivos.

9. Todos los aislamientos monofásicos fueron sumamente homogéneos en cuanto a perfil de genes de virulencia y elementos genéticos que los portan, encontrándose la mayor diversidad en el contenido en profagos. Los únicos genes de virulencia diferenciales fueron *sopE* de origen fágico y *spv* del plásmido de virulencia pSLT.
10. Aunque con baja frecuencia, se encontraron resistencias a cefalosporinas de amplio espectro/cefamicinas, fluoroquinolonas y colistina, en aislamientos de origen clínico y de alimentos pertenecientes a otros serotipos de *S. enterica*. Destaca la detección de los clones epidémicos Kentucky ST198, altamente resistentes a fluoroquinolonas, e Infantis ST32 productor de la β -lactamasa CTX-M-65 en diversos hospitales del norte de España.
11. La secuencia de inserción IS26 ha desempeñado un papel fundamental en la remodelación del plásmido pUO-STmRV1 del clon español, las regiones RR del clon europeo y la SGI1-K/SGI1-P del serotipo Kentucky. Esto se debe a su capacidad de generar inserciones, translocaciones, inversiones y deleciones y de actuar como sustrato en procesos de recombinación homóloga.
12. IS26, bien por si sola, o bien como parte de las regiones RR del clon europeo, generó las deleciones que dieron lugar al fenotipo monofásico de los tres clones. Estas deleciones varían intra- e inter-clon, pero siempre afectan a los genes *fljAB*, responsables de expresión de la flagelina de segunda fase.
13. La Tesis Doctoral puso de manifiesto como el análisis genómico puede apoyar al trabajo experimental en el seguimiento epidemiológico de clones emergentes, y en la determinación de las bases genéticas de la resistencia y la virulencia.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three overlapping circles of varying sizes, each with a bright pink center and a lighter pink outer ring. Two thin, dark pink lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom right circle.

BIBLIOGRAFÍA

“La creatividad simplemente consiste en conectar cosas”
(Steve Jobs)

- Acar, S., E. Bulut, M.J. Stasiewicz and Y. Soyer** (2019). Genoma análisis of antimicrobial resistance, virulence, and plasmid presence in Turkish *Salmonella* serovar Infantis isolates. *International J of Food Microbiol.* 307(1):108275. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108275.
- Achtman, M., J. Wain, F.X. Weill, S. Nair, et al.,** (2012). Multilocus Sequence Typing as a replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLOS Pathogens* 8(6): e1002776.
- Adams, M.D., G.C. Nickel, S. Bajaksouzian, H. Lavender, A.R. Murthy, M.R. Jacobs et al.,** (2009). Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3628:3634.
- Aguayo A., S. Mella, G. Riegedel, H. Bello, M. Domínguez y G. González-Rocha** (2016). Colistin in the post-antibiotic era. *Rev Chilena Infectol.* 33(2):166-176.
- Akira, S. y K. Takeda** (2004). Toll-like receptor signalling *Nat. Rev. Immunol.*, 4: 499-511.
- Alekshun, M.N. y S.B. Levy** (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128:1037-1050.
- Alexander, C., E.T. Rietschel** (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity *J. Endotoxin Res.*, 7:167-202.
- Alikhan, N.F., N.K. Petty, N.L.B Zakour and S.A. Beatson** (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *Alikhan et al. BMC Genomics* 2011, 12:402 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/402>.
- Alikhan, N.F., Z. Zhou, M.J. Sergeant, and M.A. Achtman** (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet* 14:e1007261. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.02.016
- Alton, N.K. and D. Vapnek** (1979). Nucleotide sequence análisis of the chloramphenicol resistance transposón Tn9. *Nature* 282: 864-869.
- Ambrose, S.J., C.J. Harmer and R.M. Hall** (2018). Evolution and typing of IncC plasmids contributing to antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Plasmid.* 2018 Sep;99:40-55. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.08.001. Epub 2018 Aug 3. *Plasmid.* 2018. PMID: 30081066.
- Amarasinghe, S.J., S. Su, X. Dong, et al.** (2020). opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biology* 21: 30. doi: 10.1186/s13059-020-1935-5.
- Andrés-Barranco, S., J.P. Vico, C.M. Marín, Herrera-León S., and R.C. Mainar-Jaime** (2016). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from pig environment.related sources and evidence of new circulating monophasic strains in Spain. *J Food Prot.* 79(3):407-412. Doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-430.
- Ansorge, W.J.** (2009). Next Generation DNA Sequencing Tecgniques and Applications. Review in *New Journal of Biotechnology N Biotechnoll.* 25: 195-203.
- Antoniadou, A., F. Kontopidou, G. Poulakou, E. Koratzanis, I. Galani, E. Papadpichelakis et al.,** (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multclonal cluster. *J Antimicrob Chemother* 59:786-790.
- Antunes P., J. Mourão, N. Pestana y L. Peixe** (2011). Leakage of emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella* clones from pig farms. *J Antimicrob Chemother* 66(9):2028–2032.
- Arai, N., T. Sekizuka, Y. Tamamura, K. Tanaka, L. Barco et al.** (2018). Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food

- animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last 4 decades. *J Clin Microbiol.* 56(5): e01758-17. doi: 10.1118/JCM.01758-17.
- Arai N., T. Sekizuka, Y. Tamamura, M. Kusumoto, A. Hinenoya et al.** (2019). *Salmonella* genomic island 3 is an integrative and conjugative element and contributes to cooper and arsenic tolerance of *Salmonella enterica*. *Antimicrob Agents Chemother.* 23; 63(9): 300429-19. doi: 10.1128/AAC.00429-19.
- Arrieta-Gisasola A., A. Atxaerandio- Landa, V. Garrido, M.J. Grilló et al.** (2020). Genotyping study of *Salmonella* 4,[5],12:i:- monophasic variant of serovar Typhimurium and characterization of the second phase flagellar deletion by whole genome sequencing. *Microorganism* 8:2049. doi: 10.3390/microorganisms8122049.
- Arndt, D., J. Grant, A. Marcu, T. Sajed, A. Pon, Y. Liang and D.S. Wishart** (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, 2016 May 3.
- Argudín, M.A., A. Hoefler and O. Butaye** (2019). Heavy metals resistance in bacteria from animals. *Research in veterinary science*, 122: 132-147. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.007.
- Avendaño, M.C.** (2001). *Introducción a la química farmacéutica*. Segunda edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España.
- Aviv, G.I., K. Tsyba, N. Steck, M. Salmon-Divon, A. Cornelius, G. Rahav et al.** (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environ Microbiol.*16: 977–994. Epub 2014 Jan 7. pmid:24320043 doi: 10.1111/1462-2920.12351 Epub 2014 Jan 7. PMID:24320043.
- Aziz, R.K., D. Bartels, A.A. Best, et al.** (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BCM Genomics* 9:75. doi: 10.1186/1771-2164-9-75.
- Bankevich, A., N. Sergey, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, et al.** (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 19(5):455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Barlag, B., and M. Hensel** (2015). The Giant Adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *Molecules.* 20(1):1134-1150. doi:10.3390/molecules20011134.
- Barquero, F.** (2004). From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 510-518.
- Barton, B.M., G.P. Harding and A.J.J. Zuccarelli** (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226: 235-240.
- Bastin, M.L.T, N.R. Neville, R.E. Parsons, A.H. Flannery, S.J. Tennant, and C.A. Johnson** (2016). An unusual case of *Salmonella* Enteritidis causing pneumonia, septic shock and multiple organ failure in an immunocompetent patient. *IDCases.* 6:85-89. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.10.004>. eCollection 2016.
- Baucheron S., S. Le Hello, B. Doublet, E. Giraud, F-X. Weill, and A. Cloeckert** (2013). *ramR* mutations affecting fluoroquinolone susceptibility in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky ST198. *Front Microbiol.* 4: 213. Published online 2013 Jul 31. doi: 10.3389/fmicb.2013.00213 PMID: 23914184.

- Bäumler, A.J., F. Heffron y R. Reissbrodt** (1997). Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J Clin Microbiol* 35:1224-1230.
- Bäumler A.J., R.M. Tsolis, T.A. Ficht y L.G. Adams** (1998). Evolution of host adaption in *Salmonella enterica*, *Infect Immun* 66:4579-4587.
- Bennet, P.M.** (2004). Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. *Methods Mol Biol* 266:71-113.
- Bennet, P.M.** (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* 153:S347-357.
- Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell and D.L. Wheeler** (2004) GenBank: update. *Nucleic Acids Res.*, 32, D23–D26.
- Bernheim, A. y R. Sorek** (2018). Viruses cooperate to defeat bacteria. *Nature* 559:482–484. doi: 10.1038/d41586-018-05762-1
- Blanc-Potard, A.B. and E.A. Groisman** (1997) The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival, *EMBO J.* 16:5376–5385.
- Blanc-Potard, A.B., F. Solomon, J. Kayser y E.A. Groisman** (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*, *J. Bacteriol.* 181:998–1004.
- Blondel, C.J, J.C. Jiménez, I. Contreras y C.A. Santiviago** (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* 10:354.
- Bobay, L-M, M. Toucho and E.P.C. Roca** (2013). Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *PNAS* 111(33): 12127-12132. doi: 10.1073/pnas.1405336111.
- Bogomolnaya, L.M., C.A. Santiviago, H-J. Yang, A.J. Baumler y H.L. Andrews-Polymenis** (2008). ‘Form variation’ of the O12 antigen is critical for persistence of *Salmonella* Typhimurium in the murine intestine. *Molecular Microbiology* 70(5):1105–1119 doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06461.x
- Boland, C., S. Bertrand, W. Nattheus, K. Dierick, V. Jasson, T. Rossel et al.** (2015). Extensive genetic variability linked to IS26 insertions in the *fljB* promoter region of atypical monophasic variants of *Salmonella* Typhimurium. *Appl Environ Microbiol.* 81: 3169-3175. doi: 10.1128/AEM.00270-15.
- Bortolaia, V., R.F. Kaas, E. Ruppe, M.C. Roberts, et al.** (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chem.* 2020 Aug 11
- Bowe F., C.J. Lippa, R.M. Tsolkis, E. Groisman, F. Heffron and J.G. Kusters** (1998). At least four percent in the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection in mice. *Infect and Immun.* 66(7): 3372-3377.
- Boyd, D.A., G.A. Peters, L. Ng y M.R. Mulvey** (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS microbiology letters* 189:285-291.
- Boyd, D., G.A. Peters, A. Cloeckert, K.S. Boumedine, E. Chalus-Dancla, H. Imberechts y M.R. Mulvey** (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183:5725–5732.

- Boyd, E., S. Porwollik, F. Blackmer y M. McClelland** (2003) Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar typhi isolates. *J Clin Microbiol* 41: 3823–3828.
- Boyd, E. y T. Barkay** (2012). The mercury resistance operon: from an origin in the geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Frontiers in Microbiology* 3:349.
- Branchu, P., M. Bawn and R.A. Kingsley** (2018). Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect Immun*. 86(8): e00079-18. doi: 10.1128/IAI.00079-18.
- Branchu, P., O.J. Charity, M. Bawn, G. Thilliez et al.** (2019). SGI-4 in monophasic *Salmonella* Typhimurium ST34 is a novel ICE that enhances resistance to copper. *Front Microbiol*. 10.1118. doi: 10.3389/fmicb.2019.01118.
- Brandis, G., S. Granstrom, A.T. Lebet, K. Bartke, L. Garoff et al.** (2021). Mutant RNA polymerase can reduce susceptibility to antibiotics via ppGpp-independent induction of a stringent-like response. *J Antimicrob Chemother*. 76, 606-615. doi: 10.1093/jac/dkaa469.
- Brüssow, H., C. Canchaya y W. Hardt** (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol R* 68: 560–602.
- Bugarel, M., S.A. Granier, G.E. Bonin, M.L. Vignaud, et al.** (2012). Genetic diversity in monophasic (1,5,[5],12:i:- and 1,4,[5],12:-:1,2) and non-motile (1,4,[5],12:-:-) variants of *Salmonella enterica* Typhimurium. *Food Research Int* 45: 1016-1024.
- Buffer-Bataillon S., P. Tattevin, M. Bonnaure-Mallet and A. Jolivet-Gougeon** (2012). Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds- a critical review. *Int Antimicrob Agents* 39(5): 381-389. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.01.011.
- Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris y Guedon** (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46:601-610.
- Bush, K. y G.A. Jacoby** (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3):969–76.
- Calvo, J. y L. Martínez-Martínez** (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27:44-52.
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, et al.** (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10(1):421.
- Campos, J., J. Mourão, L. Peixe and P. Antunes** (2019). Non-typhoidal *Salmonella* in the Pig Production Chain: A Comprehensive Analysis of Its Impact on Human Health. *Pathogens*. 8(1): 19. Published online 2019 Jan 29. doi:10.3390/pathogens8010019
- Cantas, L., S.Q.A. Shah, L.M. Cavaco, C.M. Manaia, F. Walsh et al.,** (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 4, 96.
- Cantón, R. T.M. Coque y F. Baquero** (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current opinion in infectious diseases* 16:315-325.
- Cantón, R. y T.M. Coque** (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9(5):466–75.
- Capella-Gutierrez, S., J.M. Silla-Martinez and T. Gabaldon** (2009). trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25: 1972–1973.

- Caratoli, A.** (2001 a). Importance of integrons in the difusión of resistance. *Vet Res* 32(3-4):243-259.
- Caratoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K.L. Hopkins and E.J. Threlfall** (2005). Identification of plasmids by PRC- based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219-218.
- Carattoli, A., V. Miriagou, A. Bertini, A. Loli, C. Colinon, L. Villa, et al.** (2006). Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerg Infect Dis* 12(7):1145–8.
- Carattoli, A.** (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2227-2238.
- Caratoli, A, E. Zankari, A. Garcia-Fernandez, M. Larsen, O. Lund, L. Villa, H.M. Aarestrup, H. Hasman** (2014). PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother* 58(7) 3895-903.
- Carlin, A., W. Shi, S. Dey y B.P. Rosen** (1995). The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177:981–986.
- Carpenter, C and S.M. Paine** (2014). Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in responses to oxygen and iron availability. *J Inorg Biochem.* 133: 110-117. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.01.007.
- Carraro, N., D. Matteau, P. Luo, S. Rodrigue and V. Burrus** (2014). The master activator of IncA/C conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination. *PLoS Genet.* Oct 23;10(10):e1004714. doi: 10.1371/journal.pgen.1004714.
- Casado, J.L., E. Navas, B. Frutos, A. Moreno, P. Martín, J.M. Hermida, et al.** (1997). *Salmonella* lung involvement in patients with HIV infection. *Chest.* 1997;112:1197-201. [https://doi: 10.1378/chest.112.5.1197](https://doi.org/10.1378/chest.112.5.1197).
- Casjens, S.** (2003). Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol.* 49(2):277-300. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03580.x.
- Casjens, S.R. and J.H. Grose** (2016). Contributions of P2- and P22-like prophages to undertanding the ebormous diversity and abundance of tailed bacteriophages. *Virology* 496: 255-276. doi: 10.1016/j.virol.2016.05.022.
- Cercenado M.E., R. Cantón (editores), Carla López Causapé C, González Candelas F, Tomás Carmona M, Oliver Palomo A.** (2021). Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. 2021. 71. Antonio Oliver Palomo (coordinador). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).*
- Chandler, M. and J. Mahillon** (2002). Insertion sequences revisited mobile DNA, Vol. II (Craig N.L., Craigie R., Gellert M. and Lambowitz A., eds), pp. 305-366.
- Chen, C.M., T.K. Misra, S. Silver y B.P. Rosen** (1986). Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol Chem* 261:15030–15038.
- Chen, L., J. Yu, Z. Yao, L. Sun, Y. Shen and Q. Jin.** (2005). VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, Database issue D325–D328 doi:10.1093/nar/gki008.
- Chen, J., H. Bhattacharjee and B.P. Rosen** (2015). ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth

- promoter-oxarsone. *Mol Microbiol.* Jun;96(5):1042-52. doi: 10.1111/mmi.12988. Epub 2015 Apr 6. *Mol Microbiol.* 2015. PMID: 25732202
- Chilcott, G. S., and K. T. Hughes** (1998). The type III secretion determinants of the flagellar anti-transcription factor, FlgM, extend from the aminotermminus into the anti- σ^{28} domain. *Mol. Microbiol.* 30:1029–1040.
- Chiu, C, P. Tang P, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y.Y. Chou, H.S. Wangy Y.L. Lee** (2005). The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acids Res* 33: 1690–1698.
- Chopra, I. y M. Roberts** (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 65(2):232-60.
- Clark, C.G.; C. Landgraaff, J. Robertson, F. Pollari, S. Parker, C. Nadon, et al.** (2020). Distribution of heavy metal resistance elements in Canadian *Salmonella* 4,[5],12:i:- populations and association with the monophasic genotypes and phenotype. *PLoS ONE* 15, e0236436.
- Cloekaert A., K. Praud, M. Lefevre, B. Doublet et al.** (2007). Inc11 plasmid carrying extended-spectrum- β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. 54(19): 4484-4486. doi: 10.1128/AAC.00460-10.
- CLSI** (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Corral, J.L. y E.J. Perea.** (1992). *Salmonella*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. E.J. Perea (ed.). Ed. Dogma, Barcelona. pp:647-61.
- Couturier, M., F. Bex, P.L. Bergquist y W.K. Maas** (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol reviews* 52:375-395.
- Crump, J.A., y E.D. Mintz** (2010). Global trends un typhoid and paratyphoid Fever. *Clinical infectious diseases; an oficial publication of the Infectius Diseases Society of America.* 50: 24-246.
- De Jong, H.K., C.M. Parry, T. van der Poll y W.J. Wiersinga** (2012). Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis. *PLoS Pathog* 8:e1002933.
- De la Torre, E., D. Zapata, M. Tello, W. Mejia, N. Frias, F.J. García Pena, E.M. Mateu y E. Torre** (2003). Several *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- phage types isolated from swine simples originate from serotype typhimurium DT U302. *J Clin Microbiol* 41:2395-2400.
- De Toro, M., Y. Sáenz, E. Cercenado, B. Rojo-Bezares, M. García-Campello et al.** (2013). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 32: 4-10. doi: 10.1016/j.eimc.2013.03.006.
- Del Castillo, C.S., J. Hikima, H.B. Jang, S.W. Nho, T.S. Jung, J. Wongtavatchai, et al.** (2013). Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):120-9. doi: 10.1128/AAC.01239-12. Epub 2012 Oct 15. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013. PMID: 23070174
- Delesalle, V.A., N.T. Tanke, A.C. Vill, y G. Krukonis** (2016). Testing hypotheses for the presence of tRNA genes in mycobacteriophage genomes. *Bacteriophage* 3:121. doi: 10.1080/21597081.2016.1219441.

- Doster, E., S.M. Lakin, C.J. Dean, C. Wolfe, J.G. Young, et al.** (2020). MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data, *Nucleic Acids Research*, Volume 48, Issue D1, , Pp D561–D569. Doi:10.1093/nar/gkz1010.
- Doublet, B., K. Praud, S. Bertrand, J.M. Collard, F.X. Weill, A. Cloeckaert** (2008). Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother.* 52:3745–54.
- Doublet, B., D. Boyd, G. Douard, K. Praud, A. Cloeckaert and M.R. Mulvey** (2012). Complete nucleotide sequence of the multidrug resistance IncA/C plasmid pR55 from *Klebsiella pneumoniae* isolated in 1969. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Oct;67(10):2354-60. doi: 10.1093/jac/dks251.
- Drlica, K. y X. Zhao** (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377-92.
- Duplessis, C. y N.F. Crum-Cianflone** (2011). Ceftaroline: A new cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Clin Med Rev Ther* 10;3. pii: a2466.
- Eaton, E.E., J. Dobrozycski, R. Loas, D. Laddis, G.J. Fennelly** (2002). Nontyphoidal *Salmonella* bacteremia and pneumonia as the initial manifestation of human immunodeficiency virus infection in a four-year-old child. *AIDS Patient Care STDs.* 16:247-50. <https://doi.org/10.1089/10872910260066679>.
- Echeita, M.A., A. Aladuena, S. Cruchaga y M.A. Usera** (1999). Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain. *J Clin Microbiol* 39:2981-2983.
- Echeita, M.A., S. Herrera y C. Baamonde** (2001). Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *J Clin Microbiol* 39:2981-2983.
- Edgar, R.C.** (2004) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity *BMC Bioinformatics*, (5) 113
- Edwards, R.A., G.J. Olsen, y S.R. Maloy** (2002). Comparative genomics of closely related *Salmonella*. *Trends Microbiol* 10:94-99.
- Edwards, D.J., and K.E. Holt** (2013). Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb Inform Exp* 3: 2.
- Eid, J., A. Fehr, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, et al.** (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science* 323(5910):133.138. doi: 10.1126/science.1162986.
- Ehrbar, K. y W. Hardt** (2005) Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect Genet Evol* 5: 1–9.
- Ellington, M.J., O. Ekelund, F.M. Aarestrup, R. Canton, M. Doumith et al.** (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect.* 23(1):2-22. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.012.
- Elnekave, E., S. Hong, A.E. Mather, D. Boxrud, A.J. Taylor, V. Lappi, T.J. Johnson , F. Vannucci, P. Davies, et al.** (2018). *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:in swine in the United States

- Midwest: an emerging multidrug-resistant clade. *Clin Infect Dis* 66:877–885. doi: 10.1093/cid/cix909
- Eriksson, S., S. Lucchini, A Thompson, M. Rhen y J.C. Hinton** (2003). Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 47:103-118.
- Eswarappa, S.M., J. Janice, A.G. Nagarajan, S.V. Balasundaram, G. Kanam, N.M. Dixit y D. Chakravorty** (2008). Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS One*. 3:e3829.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)** (2016). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E). As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Växjö: EUCAST; Jun 2016. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf
- European Center for Disease Prevention and Control** (2015). Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance networks (EARS-Net). Stockholm: ECDC.
- European Center for Disease Prevention and Control** (2020) Antimicrobial consumption in the EU/RRA- Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm.
- European Commission** (2013). Commission implementing decision 2013/652/EU on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. Official Journal of the European Union. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 14.11.2013:L 303. Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2013:303:FULL&from=EN>.
- European Commission Regulation** (2015). No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). OJ L 338, 22,12,2005, pp 1-26 Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/2020-03-08>.
- European Food Safety Authority** (2010) EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ): Scientific opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA J* 8(10):1826.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control** (2018). “The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017,” *EFSA Journal*, vol. 16, no. 12, Article ID 5500, p. 262.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)** (2019). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*;19(2):6406. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
- Fekih I.B., C. Zhang, Y.P. Li, Y. Zhao, H.A. Alwathnani et al.** (2018). Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes. *Font Microbiol*. 23(9): 2473. doi: 10.3389/fmicb.2018.02473.
- Feng Y., E. Lin, S. Zou, C-L. Chen y C-H. Chiu** (2019). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Sendai shows H antigen convergence with *S. Miami* and recent divergence from *S. Paratyphi A*. *BMC Genomics* 20(1):398. DOI:10.1186/s12864-019-5798-7.

- Fernández L. and R.E.W. Hancock** (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Reviews* p. 661–681.
- Fierer, J. y D.G. Guiney** (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The journal of Clinical investigation* 107:775-780.
- Fierer, J. y D. G. Guiney**, (2011). The role of the *spvC* gene in *Salmonella* Pathogenesis. *Front Microbiol.* 2:129.
- Figuroa-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol y L. Bossi** (2001) Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 39:260–271.
- Fluit, A.C. y F.J. Schmitz** (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect* 10: 272-88.
- Foley, S.L., R. Nayak, I.B. Hanning, T.J. Johnson, J. Han, and S.C. Ricke**, (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol* 77, 4273-4279. doi: 10.1128/AEM.00598-11
- Folkesson, A., A. Advani, S. Sukupolvi, J.D. Pfeifer, S. Normark y S. Lofdahl** (1999). Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease, *Mol. Microbiol.* 33: 612–622.
- Folkesson, A, S. Löfdahl y S. Normark** (2002). The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* 153: 537–545.
- Fookes, M, G.N. Schroeder, G.C. Langridge, C.J. Blondel, C. Mammia, et al.** (2011). *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathog* 7(8): e1002191.
- Franco, A., P. Leekitcharoenphon, F. Feltrin, P. Alba, G. Cordaro, M. Iurescia, et al.** (2015). Emergence of a Clonal Lineage of MultidrugResistant ESBL-Producing *Salmonella Infantis* Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS ONE* 10(12): e0144802. doi:10.1371/journal.pone.0144802
- Frye, J., E.J. Karlinsey, R.F. Heather, M. Bruz, N. Dowidar, M. McClelland y K.T. Hughes** (2006). Identification of New Flagellar Genes of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188: 2233–2243.
- Fuentes, J, N., Villagra, M. Castillo-Ruiz y G Mora** (2008). The *Salmonella* Typhi *hlyE* gene plays a role in invasion of cultured epithelial cells and its functional transfer to *S. Typhimurium* promotes deep organ infection in mice. *Res Microbiol* 159: 279–287.
- Galas, D.J. and M. Chandler** (1989). Bacterial insertion sequences. In: Berg DE, Howe MM (eds) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 109-162.
- Gallati, C., R. Stephan, H. Hächler, B. Malorny, et al.** (2013). Characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- clones isolated from human and other sources in Switzerland between 2007 and 2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(6):549-554. doi:10.1089/fpd.2012.
- Garaizar, J., S. Porwollik, A. Echeita, A. Rementeria, S. Herrera, R.M. Wong, J. Frye, M.A. Usera y M. McClelland** (2002). DNA microarray-based typing of an atypical monopasic *Salmonella enterica* serovar. *J Clin Microbiol* 40:2074-2078.

- García P., B. Guerra, M. Bances, M.C. Mendoza y M.R. Rodicio** (2011) IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:-. *J Antimicrob Chemother* 66(3):543–549.
- García, P.** (2013). Bases moleculares de la resistencia y la virulencia en la variante monofásica 4,(5),12:i:- de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo.
- García, P., B. Malorny, E. Hauser, M.C. Mendoza y M.R. Rodicio** (2013) Genetic types, gene repertoire, and evolution of isolates of the *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- Spanish clone assigned to different phage types. *J Clin Microbiol* 51(3):973–978.
- García, P., K.L. Hopkins, V. García, J. Beuthlich, M.C. Mendoza, J. Threlfall et al.** (2014). Diversity of plasmids encoding virulence and resistance functions in *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Typhimurium monophasic variant 4,[5],12,i:- strains circulating in Europe. *PLoS One* 9:e89635. Doi: 10.1016/j.fersre.2003.09.001.
- García, P., B. Malorny, M.R. Rodicio, R. Stephan, H. Hächler, B. Guerra y C. Lucarelli** (2016). Horizontal Acquisition of a Multidrug-Resistance Module (R-type ASSuT) Is Responsible for the Monophasic Phenotype in a Widespread Clone of *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i:-. *Front Microbiol* 7:680. doi: 10.3389/fmicb.2016.00680.
- García, V., I. García-Meniño, A. Mora, S.C. Flament-Simon, D. Díaz-Jiménez, J.E. Blanco, et al.** (2018). Co-occurrence of *mcr-1*, *mcr-4* and *mcr-5* genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Spain (2006-2017). *Int J Antimicrob Agents*. 52(1): 104-108. doi: 10.1016/ijantimicag.2018.03.022.
- García-Fernández, A., D. Fortini, K. Veldman, D. Mevius y A. Carattoli** (2009). Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63, 274–281. doi: 10.1093/jac/dkn470.
- García-Soto, S., M-Y. Abdel-Glil, H. Tomaso, J. Linde and U. Methner** (2020). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis of Multilocus sequence type 2283 in German broiler farms. *Front Microbiol.* 11:1771. doi: 10.3389/fmicb.2020.01741.
- García-Rodríguez, J.A., editor.** (2006). Antimicrobianos en medicina. Sociedad española de quimioterapia.
- Garcillán-Barcia, M.P., S. Redondo-Salvo, L. Vielva y F. de la Cruz** (2020). MOBscan: automated annotation of MOB relaxases. In: de la Cruz F, editor. Horizontal gene transfer: methods and protocols. *Methods in molecular biology*. New York: Springer; p. 295–308. Doi:10.1007/978-1-4939-9877-7_21.
- Garrity, G.M., J.A. Bell y T.G. Lilburn.** (2004). Taxonomic outline of Prokariotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª Edición. Release 5.0., Springer-Verlag, New York. pp: 79-122.
- Gensberg, K., Y.F. Jin, and L.J. Piddock** (1995). A novel *gyrB* mutation in a fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett.* Pp. 132:57-60. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07810.x.
- Gerdes, K., S.K. Christensen, and A. Lobner-Olesen** (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol.* 3(5):371-382. doi: 10.1038/nrmicro1147.

- Gibson, D.L., A.P. White, C.M. Rajotte y W.W. Kay** (2007). AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiol* 153:1131-1140.
- Gilbert, D.N., H.F. Chambers, S.M. Saag, A.T. Pavia, H.W. Boucher, B. Douglas, et al.** (2021). The Sanford guide to antimicrobial therapy. Sperryville, VA, USA: Antimicrobial Therapy, Inc. ISBN: 9781944272173.
- Gillen, K. L., y K. T. Hughes** (1993). Transcription from two promoters and autoregulation contribute to the control of expression of the *Salmonella* typhimurium flagellar regulatory gene *flgM*. *J. Bacteriol.* 175:7006–7015.
- Gledel, J.** (1995). En: Microbiología alimentaria. C. M. Bourgeois, J. F. Mescle y J. Zucca (eds.). Ed. Acribia, Zaragoza. pp. 53-56.
- Gouveia-Oliveira, R., P.W. Sackett and A.G. Pedersen** (2007). MaxAlign: maximizing usable data in an alignment. *BMC Bioinformatics* 8:312.
- Grimont, P.A.D. y F.X. Weill** (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur. 9th ed.
- Groisman, E.A.** (1998). The ins and outs of virulence genes expression: Mg²⁺ as a regulatory signal. *Bioassays* 20:96-101.
- Guan, S., D.A. Bastin, y N.K. Verma** (1999) Functional analysis of the O antigen glucosylation gene cluster of *Shigella flexneri* bacteriophage SfX. *Microbiology* 145: 1263–1273.
- Guerra B., S.M. Soto, J.M. Argüelles y M.C. Mendoza** (2000). Antimicrobial resistance and widespread of class 1 integrons among different *Salmonella* serotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2166-2169.
- Guerra B., S.M. Soto, J.M. Argüelles y M.C. Mendoza** (2001). Multidrug resistance is mediated by a large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent *Salmonella enterica* serotype {4,5,12:i-}. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1305-1308.
- Guerra B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth y M.C. Mendoza** (2004). Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb Drug Resist* 10:83-91.
- Guibourdenche, M., P. Roggentin, M. Mikoleit, P.I. Fields, J. Bockemuhl, P.A. Grimont y F.X. Weill** (2010). Supplement 2003-2007 (No 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol* 161:26-29.
- Gunn, J.S., C.M. Alpuche-Aranda, W.P. Loomis, W.J. Belden y S.I. Miller** (1995). Characterization of the *Salmonella* Typhimurium *pagC/pagD* chromosomal region. *J Bacteriol* 177:5040-5047.
- Gupta, A., K. Matsui, J.F. Lo et al.** (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* 5: 183–8.
- Gurevich A., V. Saveliev, N. Vyahhi y G. Tesler** (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072-1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Gutiérrez- Barranquero, J.A., E. Arrebola, N. Bonilla, D. Sarmiento et al.** (2012). Environmentally friendly treatment alternatives to Bordeaux mixture for controlling bacterial apical necrosis (BAN) of mango. *Plant Pathol.* 61:665-676. :doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02559.x.

- Haft D.H., M. DiCuccio, A. Bradetdin, V. Brover, V. Chetvernin, K. O' Neill, et al.,** (2018). RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Res.* 46:D851-D860. Doi: 10.1093/nar/gkx1068.
- Hall, R.L., R. Partridge, N. Venkatraman, and M. Wiselka** (2013). Invasive non-typhoidal *salmonella* infection with multifocal seeding in an immunocompetent host: an emerging disease in the developed world. *BMJ Case Rep.*;2013:bcr2012008230. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-008230>.
- Hamidiam, M., J. Hawkey, K.E. Holt, and R.M. Hall** (2015). Genome sequences of *Acinetobacter baumannii* strain D36, an antibiotic-resistant isolate from lineage 2 of global clone 1. *Genome Announc.* 3(6):301478-15. doi: 10.1128/genomeA.01478-15.
- Han, M.V., and C.M. Zmasek** (2009). phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics* 10: 356.
- Hancock, S.J., M.D. Phan, K.M. Peters, B.M. Forde, T.M. Chong, et al.** (2017). Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Jan 24;61(2):e01740-16. doi: 10.1128/AAC.01740-16. Print 2017 Feb. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017. PMID: 27872077.
- Haneda T., Y. Ishii, H. Danbara y N. Okada** (2009) Genome-wide identification of novel genomic islands that contribute to *Salmonella* virulence in mouse systemic infection. *FEMS Microbiol Lett* 297: 241–249.
- Hansen-Wester, I., y M. Hensel** (2002). Genome-based identification of chromosomal regions specific for *Salmonella spp.* *Infect Immun* 70: 2351–2360.
- Hardt, W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.R. Bustelo et al.** (1998). *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell.* 93(5): 815-826.
- Harmer, C. J., R. A. Moran, and R. M. Hall,** (2014). Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. *mBio* 5, e01801-01814, doi:10.1128/mBio.01801-14.
- Harmer, C.J., and R.M. Hall.** (2014). pRMH760, a precursor of A/C(2) plasmids carrying *bla*CMY and *bla*NDM genes. *Microb Drug Resist* 20, 416-423. 10.1089/mdr.2014.0012.
- Harmer, C.J. and R.M. Hall** (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid.* Jul;80:63-82. doi: 10.1016/j.plasmid.2015.04.003.
- Harmer, C.J., and R.M. Hall** (2016). PCR-based typing of IncC plasmids. *Plasmid* 87-88, 37-42, doi:10.1016/j.plasmid.2016.08.002.
- Harmer, C.J., M. Hamidian, and M.R. Hall** (2017). pIP40a, a type 1 IncC plasmid from 1969 carries the integrative element *GI**su*2 and a novel class II mercury resistance transposon. *Plasmid* 92, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.05.004>.
- Harmer, C.J., C.H. Pong and R.M. Hall** (2020). Structures bounded by directly oriented members of the IS26 family are pseudo-compound transposons. *Plasmid* 111: 102530. doi: 10.1016/j.plasmid.2020.102530.

- Hasman, H., D. Saputra, T. Sicheritz-Pontén, O. Lund, C.A. Svendsen, N. Frimodt-Møller Aarestrup** (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *FM. J Clin Microbiol.* 2014 Jan;52(1):139-46.
- Hauser E., E. Tietze, R. Helmuth, E. Junker, K. Blank, R. Prager, W. Rabsch, B. Appel, A. Fruth y B. Malorny** (2010). Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microbiol* 76(14):4601-4610.
- Hawkey, J., S. Le Hello, B. Doublet, et al.** (2019). Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microb Genom.* 5 (7):e000269.
- Hayes, F.** (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 301, 1496-1499. doi: 10.1126/science.1088157.
- Hayward, M.R., V. Jansen y M.J. Woodward** (2013). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka, two prevalent serovars associated with different livestock species in the UK. *BMC Genomics* 2013; 14: 365.
- Hayward, M.R., M. AbuOun, R.M. La Ragione, M.A. Tcho´rzewska, W.A. Cooley, et al.** (2014). SPI-23 of *S. Derby*: Role in Adherence and Invasion of Porcine Tissues. *PLoS ONE* 9(9): e107857. doi:10.1371/journal.pone.0107857.
- Hayward, M.R, L. Petrovska, V. A. A. Jansen y M. J. Woodward** (2016) Population structure and associated phenotypes of *Salmonella enterica* serovars Derby and Mbandaka overlap with host range. *BMC Microbiology* 16:15.
- He, S., A.B. Hickman, A.M. Varani, P. Siguier et al.** (2015). Insertion sequence IS26 reorganizes plasmids in clinically isolated multidrug-resistant bacteria by replicative transposition. *mBio* 6(3): e00762. doi: 10.1128/Bio.00762-15.
- Hendrix, R.W. M.C.M. Smith, R.N. Burns, M.E. Ford, y G.F. Hatfull** (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 96:2192-2197.
- Hensel, M.** (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol* 294: 95-102.
- Herrera-León, S., J.R. McQuiston, M.A. Usera ,P.I. Fields, J. Garaizar, M.A. Echeita** (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J Clin Microbiol.* 42:2581-6.
- Herrera-León, S., R. Ramiro, R. Arroyo, R. Diez, M.A. Usera y M.A. Echeita** (2006). Blind comparison of traditional aerotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Res Microbiol* 158:122-127.
- Herrero, A., M.R. Rodicio, M.A. González-Hevia and M.C. Mendoza** (2006). Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *J Antimicrob Chemother* 57: 39-45.
- Herrero, A., M.C. Mendoza, R. Rodicio y M.R. Rodicio** (2008). Characterization of pUO-StVR2, a virulence-resistance plasmid evolved from the pSLT virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4514-4517.

- Hobbie, S.N. et al.**, (2005). Analysis of the contribution of individual substituents in 4,6-aminoglycoside-ribosome interaction. *Antimicrob Agents Chemother* 49:5112-5118.
- Hidemann, D., G. Gopinath, H. Chase, F. Negrete, D. Althaus, K. Zurfluh et al.** (2017). *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human infections, Switzerland, 2010-2015: poultry-related multidrug resistance clones and an emerging ESBL producing clonal lineage. *Front Microbiol.* 13;8:1322. doi: 10.3389/fmicb.2017.01322.
- Hobman J., and L. Crossman** (2015). Bacterial antimicrobial metal iron resistance. *J Med Microbiol.* 64:471-497.
- Hooper, D.C.** (1998). Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis* 27(Suppl 1):S54-S63.
- Hopkins, K.L., E. Liebana, L. Villa, M. Batchelor, E.J. Threlfall y A. Carattoli** (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY β -lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 50(9):3203-6.
- Hopkins, K. L., M. Kirchner, B. Guerra, S.A. Granier, C. Lucarelli, M. Porrero, et al.** (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro. Surveill.* 15:19580. Available online at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19580>.
- House, D., J. Wain, J. Ho, V.A. Diep, T.S. Chinh, et al.** (2001). Serology of Typhoid Fever in an Area of Endemicity and Its Relevance to Diagnosis. *J Clin Microbiol* 39(3):1002-1007.
- Hu, H. and J. Manos** (2015). Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Jordan K., Dalmasso M. (eds) Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, vol 1301. Humana Press, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-2599-5_14.
- Hubbard, A.T.M., J. Mason, P. Roberts, C.M. Parry et al.** (2020). Piperacillin/tazobactam resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli* due to IS26-mediated amplification of *bla*_{TEM-1B}. *Nat Commun.* 11:4915. doi: 10.1038/s41467-020-18668-2.
- Huehn, S., R.M. La Ragione, M., Anjum, M. Saunders et al.** (2010). Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathog Dis.* 7:523-535.
- Hugar, M., and P. Beloeil** (2014). Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union-progress over the last ten years. *Euro Surveill.* May 15; 19(19):20804. Doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.19.20804.
- Hunter, S.B., P. Vauterin, M.A., Lambert-Fair, et al.** (2005). Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol.* 43:1045-1050.
- Hyatt, D. et al.** (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11, 119.
- Ido, N., T. Kudo, K. Sasaki, M. Motokawa et al.** (2011). Molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- isolated from cattle and humans in Iwate Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 73:241-244.

- Ikebe, T., S. Iyoda, and K. Kutsukake** (1999). Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 145:1389–1396.
- Jacoby, G.A.** (2009). AmpC -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1): 161–182. doi:10.1128/CMR.00036-08 Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
- Jang, J.C, N.K. and Lee** (2014). Fresh and hardened properties of alkali- activated fly ash/slag pastes with superplasticizers. *Constr Build Mater* 50: 169-176.
- Jang, J.G, Y.B. Ahn, H. Souri and H.K. Lee** (2015). A novel eco-firendly porous concrete fabricated with coal ash and geopolymeric binder: Heavy metal leaching characteristics and compressive strength. *Constr Build Mater* 79: 173-181. doi: 10.1016/j.conbuildmat.2015.01.058.
- Jia, B., A.R. Raphenya., B. Alcock., N. Waglechner. et al.** (2017) CARD: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45:D566–D573.
- Jiang, L, L. Feng, B. Yang, W. Zhang, P. Wang, X. Jiang y L. Wang** (2017). Signal transduction pathway mediated by the novel regulator *LoiA* for low oxygen tension induced *Salmonella Typhimurium* invasion. *PLoS Pathog* 13(6): e1006429
- Jiménez, R.J., C.A. Muñoz, A.D. Delgado y J. Torre-Cisneros** (2010). Fiebre tifoidea y otras infecciones por *Salmonella*. *Medicine* 10:2497-3501.
- Jones, G.W., D.K. Rabert, D.M. Svinarich y H.J. Whitfield** (1982). Association of adhesive, invasive and virulent phenotypes of *Salmonella Typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* 38:476-478.
- Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, F.M., Aarestrup and O. Lund** (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE* 9(8): e104984.
- Kado, C.I., and S.T. Liu** (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 145: 1365-1373.
- Katoh, K., J. Rocewicki and K.D. Yamada** (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20(4), 2019, 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Kim, M.S., Y.D. Kim, S.S. Hong, K. Park, K.S. Ko and H. Myung** (2015). Phage-encoded colanic acid-degrading enzyme permits lytic phage infection of a capsule-forming resistant mutant *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 81(3): 900-909. doi: 10.1128/AEM.02606-14.
- Kingsley, R., A. Humphries, E. Weening, M.R. de Zoete, S. Winter, A. Papaconstantinopoulou, G. Dougan y A.J. Baümeler** (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun* 71: 629–640.
- Knight, J.C., M. Knight, and M.J. Smith** (2000). Two cases of pulmonary complications associated with a recently recognised *Salmonella enteritidis* phage type, 21b, affecting immunocompetent adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19:725-6. <https://doi.org/10.1007/s100960000351>
- Köser, C.U., M.J. Ellington, and S.J. Peacock** (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics*, September 2014, Vol. 30, No. 9

- Kleckner, N.** (1981) Transposable elements in prokaryotes. *Annu Rev Genet.*;15:341–404.
- Kropinski, AM, A. Sulakvelidze, P. Konczy y C., Poppe C** (2007). *Salmonella* phages and prophages – genomics and practical aspects. *Methods Mol Biol* 394:133-175.
- Kutsukake, K., Y. Ohya y T. Iino** (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172:741–747.
- Kutsukake, K.** (1997). Autogenous and global control of the flagellar master operon, *flhD*, in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 254:440–448.
- Kutsukake, K., T. Ikebe, y S. Yamamoto** (1999). Two novel regulatory genes, *fliT* and *fliZ*, in the flagellar regulon of *Salmonella*. *Genes Genet. Syst.* 74:287–292.
- Lambert, M., y S. Smith** (2008). The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* 8:142.
- Langmead, B., and S.L. Salzberg** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9: 357–359.
- Langridge, G., S. Nair, y J. Wain** (2008): Invasive Salmonellosis in Humans. In R. C. I. A. Böck, J. B. Kaper, F. C. Neidhardt, T. Nyström, K. E. Rudd, and C. L. Squires (Ed.): *EcoSal-Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM Press, Washington, D.C.
- Lanza, V.F., M. de Toro, M.P. Garcillán-Barcia, et al.** (2014). Plasmid Flux in *Escherichia coli* ST131 Sublineages, Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genet*, 10, e1004766.
- Laorden, L., S. Herrera-Leon, I. Martínez, A. Sanchez, L. Kromidas, J. Bikandi, et al.** (2010). Genetic evolution of the Spanish multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,5,12:i:- monophasic variant. *J. Clin. Microbiol.* 48:4563–4566. doi: 10.1128/JCM.00337-10.
- Larsen, M., S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Rundsten, H. Hasman, et al.** (2012). Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J Clin Microbiol.*, 50(4), 1355-1361.
- Larsen, M.V., S. Cosentino, O. Lukjancenko, D. Saputra, S. Rasmussen, et al.** (2014), Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *J Clin Microbiol.* 52(5):1529-39.
- Lartigue, M.F., V. Leflon-Guibout, L. Poirel, P. Nordman et al.** (2002). Promoters P3, Pa/Pb, P4 and P5 upstream from *bla*(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 46:4035-4037. doi: 10.1128/AAC.46.12.4035-4037.2002.
- Ledermann, W.D.** (2003). A history of the Eberth bacillus from Junker to Germanier. *Rev Chil Infect.* pp 58-61.
- Leekitchanonphon, P., O. Lukjancenko, C. Friis, F.M. Aarestrup and D.W. Ussery** (2012). Genomic variation in *Salmonella enterica* core genes for epidemiological typing. *BMC Genomics* 13:88 doi: 10.1186/1471-2164-13-88
- Le Hello, S., R.S. Hendriksen, B. Doublet, I. Fisher, E.M. Nielsen, J.M. Whichard, et al.** (2011). International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infec Dis.* 204: 675–684.
- Le Hello, S., F-X. Weill, V. Gilbert, K. Praud et al.,** (2012). Early strains of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Kentucky sequence type 198 from Southeast Asia harbor *Salmonella*

- genomic island 1-J variants with a novel insertion sequence. *Antimicrobe Agents Chemother* 56, 5096-5012. doi: 10.1128/AAC.00732-12.
- Le Hello, S., A. Bekhit, S. Granier, H. Barua, J. Beutlich, M. Zając, et al.** (2013a) The global establishment of a highly-fluoroquinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 strain. *Frontiers in Microbiology* 4.
- Le Hello, S., D. Harrois, B. Bouchrif, L. Sontag, D. Elhani, V. Guibert, et al.** (2013b). Highly drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198-X1: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 13(8):672–9.
- Levings, R.S., S.R. Partridge, S.P. Djordjevic, and R.M. Hall,** (2007). SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 317-323. doi: 10.1128/AAC.01229-06.
- Levy, S.B. y B. Marshall** (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10(12):122-129.
- Li, W., I. Jaroszewski and A. Godzik** (2001). Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics* 17(3):282–3.
- Li, W. and A. Godzik** (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22: 1658–1659
- Li, H. and R. Durbin** (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, et al.** (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079.
- Li, R., M. Xie, J. Zhang, L. Liu, X. Liu et al.** (2017). Genetic characterization of mcr-1-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J Antimicrob Chemother* 72: 393-401. doi: 10.1093/jac/dkw411.
- Liebert, C., R. Hall y A. Summers** (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 507-522.
- Liu, B., D. Zheng, Q. Jin, L. Chen y J. Yang** (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, Database issue D687–D692 doi: 10.1093/nar/gky1080.
- Livermore, D.M.** (2008). Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect* 14:3–10.
- Lobb B. y A.C. Doxei** (2016). Novel function discovery through sequence and structural data mining. *Curr Opin Struct Biol.* 38_53-61. Doi: 10.1016/j.sbi.2016.05.017.
- Llobet, E., J.M. Thomas y J.A. Bengoechea** (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiol* 154(12):3877-3886.
- Llobet, E., M.A. Campos, P. Gimenez, D. Moranta y J.A. Bengoechea** (2011). Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun* 79(9):3718-3732.
- Lin, Y.F., A.R. Walmsley y B.P. Rosen** (2006). An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:15617-15622.

- Liu, Y.Y., Y. Wang, T.R. Walsh, et al.** (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16: 161-168.
- Lucarelli, C., A.M. Dionisi, M. Torpdahl, L. Villa, C. Graziani, K. Hopkins, J. Threlfall, A. Caprioli y I. Luzzi** (2010) Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 48(6):2103–2109.
- Lucarelli, C., A.M. Dionisi, E. Filetici, S. Owczarek, I. Luzzi y L. Villa** (2012). Nucleotide sequence of the chromosomal region conferring multidrug resistance (R-type ASSuT) in *Salmonella* Typhimurium and monophasic *Salmonella* Typhimurium strains. *J Antimicrob Chemother* 67(1):111–114.
- Luk, J.M., U. Kongmuang, P.R. Reeves y A.A. Lindberg** (1993). Selective amplification of a bequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D). *J Clin Microbiol.* 31: 2118-23.
- McArthur, A.G., n. Waglechner, F. Nizam, et al.** (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Atimicrob Agents Chemother.* 57(7): 3348-3357. Doi: 10.1128(AAC.00419-13.
- Macrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayers and S.M. McCowen** (1978). A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* 1:417-420.
- Magnet, S. y J.S. Blanchard** (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* 105(2):477-498.
- Mahillon, J. and M. Chandler** (1998). Insertion sequences. *Microbiol and Molecular Biol Rev.* 2:725-774.
- Main-Hester, K.L, K.M. Colpitts, G.A. Thomas, F.C. Fang y S.J. Libby** (2008). Coordinate regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI1) and SPI4 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun.* 76:1024-1035.
- Marcus, S.L., J.H. Brumell, C.G. Pfeifer y B.B. Finlay** (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2:145:145-156.
- Mastrorilli, E.; D. Pietrucci, L. Barco, S. Ammendola, S. Petrin, A. Longo, C. Mantovani, et al.** (2018). A Comparative Genomic Analysis Provides Novel Insights Into the Ecological Success of the Monophasic *Salmonella* Serovar 4,[5],12:i. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 715.
- Mavris M., P. Manning y R. Morona** (1997) Mechanism of bacteriophage SfII-mediated serotype conversion in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 26: 939–950.
- Mayer, H., U.R. Bhat, H. Masoud, J. Radziejewska-Lebrecht, C. Widemann y J.H. Krauss** (1989). Bacterial lipopolysaccharides. *Pure & App. Chem.* 61: 1271-1282.
- McCalla, D.R.** (1979) Nitrofurans. In: Hahn FE, ed., *Antibiotics*, vol 1, 1st edn. New York: Springer-Verlag, p. 176–213.
- McClelland, M., K. Sanderson, J. Spieth, S.W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik et al.,** (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413: 852–856.

- McDermott, P.F., R.D. Walker y D.G. White** (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22(2):135-143.
- McQuiston, J.R., P.I. Fields, R.V. Tauxe y J.M. Logsdon** (2008). Do *Salmonella* carry spare tyres? *Trends Microbiol.* 16; 142-148.
- Medardus, J.J, Z.M. Bayleyegn, M. Nicol, W.M. Morrow, P.J. Rajala-Schultz, et al.** (2014). In feed use of heavy metal micronutrients in U.S. swine production systems and its role in persistence of multidrug resistant *Salmonellae*. *Applied Environ Microbiol.* 80(7): 2317-2325. doi: 10.1128/AEM.04283-13.
- Méndez, Y.R. y M.C. Barrera** (2015). Fisiopatología de la sepsis por bacterias gram negativas: bases moleculares. *Cuarzo*; 21 (2): 88-103.
- Meltzer, E., y E. Schwartz** (2010). Enteric fever: a travel medicine oriented view. *Current opinion in infectious diseases* 23:432-437.
- Mergeay M., S. Monchy, T. Vallaey, A. Bossus et al.** (2003). *Ralstonia metallisurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* 27: 385-410.
- Miao, E, C. Scherer, R. Tsohis, R. Kingsley, L. Adams, A. Bäuml y S. Miller** (1999). *Salmonella* typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* 34: 850–864.
- Miller, SI, A.M. Kukral y J.J. Mekalanos** (1989). A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella* typhimurium virulence. *P Natl Acad Sci USA* 86: 5054–5058.
- Minamino, T., T. Iino, and K. Kutuskake** (1994). Molecular characterization of the *Salmonella* typhimurium *flhB* operon and its protein products. *J. Bacteriol.* 7630–7637.
- Mingeot-Leclercq M.P. y P.M. Tulkens** (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agent Chemother* 43(5):1003-1012.
- Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación** (2020). 2018 Informe de zoonosis.
- Miriagou, V., A. Carattoli y S. Fanning** (2006). Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 8: 1923-1930.
- Mizrachi, I.** (2002). Genbank: The Nucleotide Sequence Database. Oct 9 [Update 2007 Ag 22] In: McEntryre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2002- Chapter 1
- Mossel, D.A., B. Moreno y C.B. Struijk** (2002). En: *Microbiología de alimentos*. 2ª edición. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Mourão J., J. Machado, C. Novais, P. Antunes y L. Peixe** (2014). Characterization of the emerging clinically-relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- (monophasic variant of *S. Typhimurium*) clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:2249–2257. Doi: 10.1007/s10096-014-2180-1
- Mourão, J.; C. Novais, J. Machado, L. Peixe, and P. Antunes** (2015) Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2015, 45, 610–616.

- Mourão, J., A. Rebelo, S. Ribeiro, L. Peixe, C. Novais and P. Antunes** (2020). Tolerance to arsenic contaminant among multidrug-resistant and copper-tolerant *Salmonella* successful clones is associated with diverse ars operons and genetic contexts. *Environ Microbiol.* 22(7): 2829-2842. doi: 10.1111/1462-2920.15016.
- Nang, S.C., J. Li, and T. Velkov, (2019). The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance. *Crit Rev Microbiol* 45, 131-161. 10.1080/1040841X.2018.1492902
- Nassonova, E.E.** (2008). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology.* 2: 557-565. doi: 10.1134/S1990519X0860011.
- Nigro, S.J. and R.M. Hall** (2011). *GI_{sul2}*, a genomic island carrying the *sul2* sulphonamide resistance gene and the small mobile element CR2 found in the *Enterobacter cloacae* subspecies *cloacae* type strain ATCC 13047 from 1890, *Shigella flexneri* ATCC 700930 from 1954 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 from 1951. *J Antimicrob Chemother.* Sep;66(9):2175-6. doi: 10.1093/jac/dkr230. Epub 2011 Jun 8. *J Antimicrob Chemother.* 2011. PMID: 21653606.
- Nuccio, S.P. y A.J. Baumler** (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 551–575.
- Nuccio, S.N., N.R. Thomson, M.C. Fookes y M.F. Kagnoff** (2011). Fimbrial signature arrangements in *Salmonella*. En *Salmonella From genome to function*. Ed por Steffen Porwollik, Ed. Caister Academic Press, San Diego CA, USA. pp: 149-161.
- Oladeinde, A., K. Cook, A. Orlek, G. Zock, K. Herrington, N. Cox, et al.** (2018). Hotspot mutations and ColE1 plasmids contribute to the fitness of *Salmonella* Heidelberg in poultry litter. *PLoS One* 13, e0202286. doi: 10.1371/journal.pone.0202286
- Pal, C., K. Asiani, S. Arya, C. Rensing et al.** (2017). Metal resistance and its association with antibiotics resistance. *Advances in Microb Physiol* ISSN: 0065-2911. doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.02.001.
- Palma, F., G. Manfreda, M. Silva et al.** (2018). Genome-wide identification of geographical segregated genetic markers in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium variant 4,[5],12:i:-. *Sci Rep* 8, 15251. doi: 10.1038/s41598-018-33266-5.
- Parkhill, J., G. Dougan, K. James et al.** (2001) Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* 413: 848–852.
- Parry, C.M. y E.J. Threlfall** (2008). Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *salmonellae*. *Curr Opin Infect Dis* 21(5):531-538.
- Paulsen, I.T., T.G. Littlejohn, P. Radstrom, et al.** (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 761-768.
- Patridge, S.R.** (2011). Analysis of antibiotics resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 35:820-855. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
- Payne, M., K. Sandeep, Q. Wang, D. Hennessy, L. Luo, S. Octavia, M.M. Tanaka, Sintchenko Vitali, Lan Ruiting** (2020). Multilevel genome typing: genomics-guided scalable resolution typing of microbial pathogens. *Euro Surveill.* 25(20):pii=1900519. Doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.20.1900519.

- Pearce, M.E., M.A. Chattaway, K. Grant, C.J. Martin and A. Maiden** (2020). A proposed core genoma scheme for analyses of the *Salmonella* genus. *Genomics* 22(1): 371-378. ISSN 0888-7543. doi: 10.1016/j.ygeno.2019.02.016.
- Petrovska, L., A.E. M ther, M. AbuOun, P. Branchu, S.R. Harris et al.** (2016). Microevolution of monophasic *Salmonella* Typhimurium during epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerg Infect Dis.* 22(4): 617-624. doi: 10.3201/eid2204.150531.
- Pham, T.D.M., Z.M. Ziora and A.T. Mark** (2019). Quinolones antibiotics. *Medchemcomm.* 10(10):1719-1739. doi: 10.1039/c9md00120d.
- Poirel, L., K. Kieffer, and P. Nordmann,** (2017). In vitro study of IS*AplI*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother* 61. 10.1128/AAC.00127-17.
- Polz, M.F., E.J. Alm, and W.P. Hanage** (2013). Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends Genet* 29:170–175.
- Popoff, M.Y.** (2001). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 8th revisión. WHO Collaborating for Reference and Research on *Salmonella*. Paris: Institut Pasteur.
- Popoff, M.Y., J. Bockemühl y L.L. Gheesling** (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 155:568-570.
- Porwollik, S., R.M. Wong, M. McClelland** (2004). Evolutionary genomics of *Salmonella*: gene acquisitions revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:8956-8961.
- Prager, R., A. Fruth y H. Tschape** (1995). *Salmonella* enterotoxin (*stn*) genes is prevalent among strains of *Salmonella enterica*, but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 12:47-50.
- Quintiliani R. Jr, R. Quintiliani, C. Nightingale** (2004). Aminoglucoosydes. En: Cohen & Powderly, editors. *Infectious diseases*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier. Pp: 1809-1818.
- Rabsch, W., S. Truepschuch, D. Windhorst y R.G. Gerlach** (2011). Typing phages and prophages of *Salmonella*, En: *Salmonella: From genoma to function*. Ed. Por Steffen Porwollik, Ed. Caister Academic Press, San Diego CA, USA. pp:25-48.
- Randall, C.P., A. Gupta, N. Jackson, D. Busse and A.J. O' Neill** (2015). Silver resistance in Gram-negative bacteria: a dissection of endogenous and exogenous mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 70(4): 1037-1046. doi: 10.1093/jac/dku523.
- Raffatellu, M., D. Chessa, R. P. Wilson, C. Tükel, M. Akçelik y A. J. Bäumlér,** (2006). Capsuled-mediated immune evasión: a new hypothesis explaining aspects of typhoid fever pathogenesis. *Infect Inmum.* 74: 19-27.
- Raffatellu, M., R. P. Wilson, S. E. Winter y A. J. Bäumlér,** (2008). Clinical Pathogenesis of typhoid fever. *J Infect Dev Ctries.* 2: 260-266.
- Relman, D.A. y S. Falkow** (1997). En: *Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica*. 4º edición. G.L. Mandell, J.E. Bennet y R. Dolin (eds.). Ed. Panamericana. Buenos Aires. pp: 21-29.
- Resning C., and G. Grass** (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing enviroment. *FEMS Microbiol Rev.* 27(2-3): 197-203. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00049-4.

- Rigsby, R., F. Fillgrove, L. Beihoffer y R. Armstrong** (2005). Fosfomycin resistance proteins: A nexus of glutathione transferases and epoxide hydrolases in a metalloenzyme superfamily. *Methods in Enzymology* 401:367.
- Robinson, O., D. Dylus and C. Dessimoz** (2016). Phylo.io: interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web. *Mol Biol Evol.* 33(8):2163–6.
- Roer, L., R.S. Hendriksen, P. Leekitcharoenphon, O. Lukjancenko, R.S. Kaas, H. Hasman and F.M. Aarestrup** (2016). Is the evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* linked to restriction-modification systems? *mSystems* 1(3): e00009-16. doi:10.1128/mSystems.00009-16.
- Rodicio, M. R., A. Herrero, I. Rodríguez, P. García, I. Montero, J. Beutlich, y M.C. Mendoza** (2011). Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Rev Med Microbiol* 22(3): 55-65.
- Rodríguez, I., M.C. Martín, M.C. Mendoza y M.R. Rodicio** (2006 a). class 1 and class 2 integrons in non-prevalent serovars of *Salmonella enterica* structure and association with transposons and plasmids. *J. Antimicrob. Chemother* 58:1124-1132.
- Rodríguez, I., M.R. Rodicio, S. Herrera-León, A. Echeita y M.C. Mendoza** (2008). Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. *International journal of antimicrobial agents* 32:158-164.
- Rodríguez-Martínez, J.M., M.E. Cano, L. Martínez-Martínez and A. Pascual** (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17:149–182. doi: 10.1007/s10156-010-0120-2.
- Rosen, B.** (2002). Biochemistry of arsenic detoxification. *FEMS Microbiology Letters* 529:86-92.
- Rotger-Anglada R., editor.** (2000). *Microbiología sanitaria y clínica*. Editorial Síntesis.
- Rozwandowicz, M., M.S.M. Brouwer, J. Fischer, J.A. Wagenaar, B. González-Zorn, B. Guerra et al.,** (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 73: 1121-1137.
- Roux, S., F. Enault, B.L. Hurwitz, and M.B. Sullivan** (2015a). VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *Peerj*.985.
- Roux, S., S.J. Hallam, T. Woyke, and M.B. Sullivan** (2015b). viral dark matter and virus-host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *eLife* 5: e08490. doi: 10.7554/eLife.08490.
- Sabbagh, SC, M.G. Forest, C. Lepage, J.M. Leclerc y F. Daigle** (2010). So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett.* 305 (1): 1–13.
- Saeed, N.K.** (2016). *Salmonella* pneumonia complicated with encysted empyema in an immunocompromised youth: Case report and literature Review. *J Infect Dev Ctries.* 10:437-44. <https://doi.org/10.3855/jidc.7069>.
- Saitou, N. and M. Nei** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4): 406–25.
- Sampei, G., N. Furuya, K. Tachibana, Y. Saitou, T. Suzuki, K. Mizobuchi y T. Komano** (2010). Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64. *Plasmid* 64:92-103.

- Schmidt, S. y M. Hensel** (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiol reviews* 17:14-56.
- Seeman T.** (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 30:2068-2069. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Shah D.H., L. M. Lee, J. Park, J. Lee, S. Eo, J. Kwon y J. Chae** (2005). Identification of *Salmonella* gallinarum virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 151:3957–3968 DOI 10.1099/mic.0.28126-0.
- Shah, D.H., N.C. Paul, W.C. Sischo, R. Crespo, and J. Guard,** (2017). Population dynamics and antimicrobial resistance of the most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. *Poult Sci* 96, 687-702. doi: 10.3382/ps/pew342
- Shaw, K.J., et al.** (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57:138-163.
- Shi L., J.N. Adkins, J.R. Coleman, et al.** (2006). Proteomic analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated from RAW 264.7 macrophages: identification of a novel protein that contributes to the replication of serovar typhimurium inside macrophages. *J Biol Chem* 281: 29131–29140.
- Siguié, P., E. Gourbeyre and M. Chandler** (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 38(5)865-891. doi: 10.1111/1574-6976.12067.
- Siguié P., E. Gourbeyre, A. Varani, B. Ton-Hoang and M. Chandler** (2015). Everyman's guide to bacterial insertion sequences. *Microbiol Spectr.* 3(2):MDNA3-0030-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014.
- Siguié, P. E. Gourbeyre and M. Chandler** (2017). Known knowns, know unknowns and unknown unknowns in prokaryotic transposition. *Current Opinion Microbiol.* 38: 171-180.
- Silipo, A., M.R. Leone, R. Lanzetta, M. Parrilli, G. Lackner, B. Busch, C. Hertweck, A. Molinaro** (2012). Structural characterization of two lipopolysaccharide O-antigens produced by the endofungal bacterium *Burkholderia* sp. HKI-402 (B4) *Carbohydr. Res.*, 347: 95-98.
- Silver, S. y L.T. Phung** (2005). Genes and enzymes involved in bacterial Oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environmental Microbiology* 71:599-608.
- Silver, S., T. Phung Le y G. Silver** (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 627–34.
- Sjölund- Karlsson, M., K. Joyce, K. Blickenstaff, T. Ball, J. Haro, F.M. Medalla et al.** (2011). Antimicrobial susceptibility to azithromycin among *Salmonella enterica* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 55(9):3985-3989. doi: 10.1128/AAC.00590-11.
- Slipski, C.J., R.T. Jamieson-Datzkiw, G.G Zhanel and Denise C.B.** (2021). Characterization of proteobacterial plasmid integron-encoded *qac* efflux pump sequence diversity and quaternary ammonium compound antiseptic selection in *E. coli* grown planktonically and as biofilms Characterization of proteobacterial plasmid integron-encoded *qac* efflux pump sequence diversity and quaternary ammonium compound antiseptic selection in *E. coli* grown planktonically and as biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* Jul 19: AAC0106921.

- Snesrud, E., S. He, M. Chandler, J.P. Dekker, A.B. Hickman, P. Mcgann, et al.** (2016). A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*Apl1*. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 6973-6976. 10.1128/AAC.01457-16
- Snesrud, E., P. Mcgann, and M. Chandler** (2018). The birth and demise of the IS*Apl1*-*mcr-1*-IS*Apl1* composite transposon: the vehicle for transferable colistin resistance. *mBio* 9. 10.1128/mBio.02381-17
- Sokal, R.R. and C.D. Michener** (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin* 28:1409–38.
- Sohn, J., and J-W Nam.** (2018). The present and future of the *novo* whole-genome assembly. *Brief Bioinformatics*. 19: 23-40.
- Songzhe F., S. Octavia, M.M. Tanaka, V. Sintchenko and R. Lan** (2015). Defining the core genome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for genomic surveillance and Epidemiological Typing. *J Clin Microbiol.* 53(8): 2530-n2538. doi: 10.1128/JCM.03407-14.
- Soyer Y., A. Moreno Switt, M.A. Davis, J. Maurer, P.L. McDonough, D.J. Schoonmaker-Bopp, N.B. Dumas, T. Root, L.D. Warnick, Y.T. Grohn y M. Wiedmann** (2009). *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. *J Clin Microbiol* 47(11):3546–3556.
- Soyer Y., S.D. Alcaine, D.J. Schoonmaker, T.P. Root, L.D. Warnick et al.** (2010). Pulsed- field gel electrophoresis diversity of human and bovine clinical *Salmonella* isolates. *Foodborne Pathog Dis.* 7(6): 707-7017. doi: 10.1089/fpd.2009.0424.
- Spanò, S, J. Ugalde y J. Galán** (2008) Delivery of a *Salmonella* Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3: 30–38. Tacket C, Hone D, Curtiss.
- Spratt, B.G.** (1994). Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264(5157):388-393.
- Srividhya, K.V., G.V. Rao, L. Raghavenderan et al.** (2006). Database and comparative identification of prophages. In: Huang D-S, Li K, Irwin GW, editors. *Intelligent Control and Information Sciences*. Vol. 344. Berlin: Springer; pp. 863-868.
- Staelin B.M., J.G. Gibbons, A. Rokas, T.V. O'Halloran and J.C. Slot** (2016). Evolution of a heavy metal homeostasis/ resistance island reflects increasing copper stress in Enterobacteria. *Genome Biol Evol.* 8(3): 811-826. doi: 10.1093/gbe/evw031.
- Stamatakis, A.** (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Saltykova, A., v. Wuyts, W. Mattheus, S. Bertrand, N.H.C. Roosens, K. Marchal, et al.** (2018) Comparison of SNP-based subtyping workflows for bacterial isolates using WGS data, applied to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and serotype 1,4,[5],12:i:-. *PLoS ONE* 13(2): e0192504. doi:10.1371/journal.pone.0192504.
- Stokes, H.W. y R. M. Hall** (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12):1669-1683.
- Stokes, H.W. and R. M. Hall** (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12):1669-1683.

- Sullivan, M.J., N.K. Petty and S.A. Beatson** (2011). Easyfig: a genome comparison visualization. *Bioinformatics*. Vol. 27 no. 7 2011, pages 1009–1010 doi:10.1093/bioinformatics/btr039.
- Switt, A. I., Y. Soyer, L. D. Warnick, y M. Wiedmann,** (2009). Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:407-415.
- Tacconelli, E., E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.I. Monnet, et al.** (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18, 318-327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Tang, S., R.H. Orsi, H. Luo, C. Ge, G. Zhang, R.C. Baker, A. Stevenson and .M Wiedmann** (2019). Assessment and Comparison of Molecular Subtyping and Characterization Methods for *Salmonella*. *Front. Microbiol.* 10:1591. doi: 10.3389/fmicb.2019.01591
- Tassinari, E., M. Bawn, G. Thilliez, O. Charity, L. Acton et al.** (2020). Whole-genome epidemiology links phage-mediated acquisition of a virulence gene to the clonal expansion of a pandemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clone. *Microbial Genomics*. Vol 6. doi: 10.1099/mgen.0.000456.
- Tate, H., J.P. Folster, C.H. Hsu, J. Chen, M. Hoffmann, C. Li et al.** (2017). Comparative analysis of extended-spectrum β -lactamase CTX-M-65 producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from human, food animals, and retail chickens in United States. *Antimicrobe Agents Chemother* 61(7): e00488-17. doi:10.1128/AAC.00488-17.
- Threlfall, E.J., B. Rowe, J.L. Ferguson and L.R. Ward** (1986). Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 204c isolated in Britain. *J Hyg (Lond)* 97:419-426.
- Thomson, N., S. Baker, D. Pickard, M. Fookes, M. Anjum, N. Hamlin, J. Wain, D. House, Z. Bhutta, et al.,** (2004) The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Biol* 339: 279–300.
- Tindall, B.J., P.A. Grimont, G.M. Garrity, y J.P. Euzeby,** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:521-524.
- Toleman, M.A. P.M. Bennett y T.R. Walsh** (2006). ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev* 70:296-316.
- Torres, A., M.S. Niederman, J. Chastre, S. Ewig et al.** (2017). International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 50:1700582. doi: 10.1183/12993003.00582-2017.
- Townsend, S.M., N.E. Kramer, E. Edwards, S. Barker, N. Hamlin, et al.** (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun.* 69(5):2894-2901. doi: 10.1128/IAI.69.5.2894-2901.2001.
- Tracz, D.M., H. Tabor, M. Jerome, L.K. Ng y M.W. Gilmour** (2006). Genetic determinants and polymorphisms specific for human-adapted serovars *Salmonella enterica* that cause enteric fever. *J Clin Microbiol* 44:2007-2018.

- Treangen, T.J., B.D. Ondov, S. Koren and A.M Phillippy** (2014). The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol*, 15 (11): 524
- Trimble M.J., P. Mlynářčík, Kolář M. y R.E.W. Hancock** (2016). Polimyxin: alternative mechanism of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 6(10):a025288. doi: 10.1101/cshperspect.a025288.
- Trüpschuch, S., J.A. Laverde, I. Ediberidze, A. Flieger et al.** (2010). Characterization of multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium 4,[5],12:i- DT193 strain carrying a novel island adjacent to the thrW tRNA locus. *Int J Med Microbiol*. 300: 279-288.
- Uzzau, S., D.J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesús, D. J. Platt y J. E. Olsen** (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol. Infect.* 125:229-255.
- Vakulenko, S.B., et al.** (2003). Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 16:430-450.
- Van Hoek, A.H., D. M evius, B. Guerra, P. Mullany, A.P. Roberts y H.J. Aarts** (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2:203.
- Vázquez, X.** (2016). Análisis bioinformático de la secuencia de un plásmido de virulencia-resistencia de *Salmonella enterica* obtenida por técnicas de primera, segunda y tercera generación. Trabajo Fin de Máster.
- Ventola C.L.** (2005). The antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40(4):277-283.
- Vernikos, G.S., y J. Parkhill** (2006). Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands. *Bioinformatics* 22(18): 2196–2203, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl369>
- Vernikos, G.S., N.R. Thomson y J. Parkhill** (2007) Genetic flux over time in the *Salmonella* lineage. *Genome Biol* 8: R100.
- Vielva L., M. de Toro, V.F. Lanza y F. de la Cruz** (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. 33(23):3796-3798. doi: 10.1093/bioinformatics/btx462.
- Wales, A.D., and R.H. Davies** (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics (Basel)* 13;4(4);567-604. doi: 10.3390/antibiotics4040567.
- Wallis, T.S. y E.E. Galyov** (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol. Microbiol.* 36:997-1005.
- Wang, J., R. Stephan, M. Karczmarczyk, Q. Yan, H. Hächler y S. Fanning** (2013). Molecular characterization of blaESBL-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Front Microbiol* 4:1–9.
- Wang, W., Q. Guo, X. Xu, Z.K. Sheng, X. Ye y M. Wang** (2014). High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-1 with two start codons. *J Med Microbiol*. 63:1454-9.
- Watson, P.R., S.M. Paulin, A.P. Bland, S.J. Libby, P.W. Jones y T.S. Wallis** (1999). Differential regulation of enteric and systemic salmonellosis by *slyA*. *Infect Immun* 67:4950-4954.

- WHO** (2016). Critically important antimicrobials for human medicine. Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) (5th revision).
- Welch, T.J., W.F. Fricke, P.F. McDermott, D.G. White, M.L. Rosso, D.A. Rasko, et al.** (2007). Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*. 2007 Mar 21;2(3):e309. doi: 10.1371/journal.pone.0000309. *PLoS One*. 2007. PMID: 17375195
- Weening, E.H., J.D. Barker, M.C. Laarakker, A.D. Humphries, R.M. Tsois, et al.** (2005). The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf, bcf, stb, stc, std, and sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* 73: 3358–3366.
- Weill, F-X., S. Bertrand, F. Guesnier, S. Baucheron, P.A.D Grimont, et al.** (2006). Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky [letter]. *Emerg Infect Dis*. [serial on internet] doi: 10.3201/eid1210.060589.
- Wood, M.W., R. Rosqvist, P.B. Mullan, M.H. Edwards and E.E. Galyov** (1996). *sopE*, a secreted protein of *Salmonella* dublin, is translocated into the target eukaryotic cell via a *sip*-dependent mechanism and promotes bacterial entry. *Mol Microbiol*. 22(2): 327-338. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.00116.x.
- Wright, G.D.** (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* 57(10):1451-1470.
- Yang, H.C. and B.P. Rosen** (2016). New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed J*. Feb;39(1):5-13. doi: 10.1016/j.bj.2015.08.003. Epub 2016 Apr 1. *Biomed J*. 2016. PMID: 27105594
- Yue, M., S.C. Rankin, R.T. Blanchet, J.D. Nulton, R.A. Edwards y D.M. Schifferli** (2012). Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro-and microevolution. *PLoS One* 7:e38596.
- Zamperini, K., V. Soni, D. Waltman, S. Sánchez, et al.** (2007). Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian diseases* 51: 958-964.
- Zankari, E., H. Hasman, S. Consentino, et al.** (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
- Zankari, E., R. Allesão, K.G. Joensen, L.M. Cavaco, O. Lund, F.M. Aarestrup** (2017). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chem*. 2017 July 19. doi:10.1093/jac/dkaa345.
- Zerbino, D.R., and E. Birney** (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 18: 821–829.
- Zerbino, D.R.** (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Curr Protoc Bioinformatics* chapter 11: unit 11.5. doi: 10.1002/0471250953.bi1105s31.
- Zhang S., Y. Yin, M.B. Jones, Z. Zhang, et al.** (2015). *Salmonella* Serotype Determination Utilizing High-throughput Genome Sequencing Data. *J. Clin. Microbiol* 53(5) 1685-92.
- Zhou, D. y J. Galán** (2001). *Salmonella* entry into host cells: to work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect*. 3:1293-1298.

Zhou, Y., Y. Liang, K.H. Lynch, J.J. Dennis and D.S. Wishart (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.*, 39, W347–W352.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three sets of concentric circles in shades of pink and magenta. The largest set is at the top, a medium-sized set is in the middle, and a large set is at the bottom right. Thin pink lines extend from the top left towards the circles, and another line extends from the top right towards the bottom right circle.

ANEXOS

“El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquél quien hace las preguntas correctas”
(Claude Lévi-Strauss)

6.1. Aislamientos de *Salmonella* analizados en este trabajo

Anexo I. Aislamientos monofásicos de origen clínico detectados durante el periodo 2008-2018 en el Principado de Asturias y analizados en este trabajo.

Aisamiento ^a	Procedencia ^b	Origen	Paciente ^c		Fafotipo ^d	Serotipo ^e
			Sexo	Edad		
LSP 207/08	HMN	Heces	M	70	U302	4,5,12:i-
LSP 255/08	INS	Heces	H	2	RDNC	4,5,12:i-
LSP 196/10	HJ	Heces	M	32	U302	4,5,12:i-
LSP 207/10	HVN	Heces	H	1	U311	4,5,12:i-
LSP 251/10	HUC	Heces	M	54	DT138	4,5,12:i-
LSP 254/10	HVN	Heces	H	58	DT193	4,5,12:i-
LSP 74/11	HUCA	Heces	H	2	U311	4,5,12:i-
LSP 80/11	INS	Heces	M	3	DT193	4,5,12:i-
LSP 111/11	HJ	Heces	M	8	DT104	4,5,12:i-
LSP 116/11	HUC	Heces	H	45	U311	4,5,12:i-
LSP 117/11	HVN	Heces	H	8	DT104	4,12:i-
LSP 128/11	HUC	Heces	M	3	DT104	4,12:i-
LSP 155/11	HCN	Heces	M	88	RDNC	4,5,12:i-
LSP 202/11	HUSA	Heces	M	4	DT138	4,5,12:i-
LSP 208/11	HUSA	Heces	H	9	U311	4,5,12:i-
LSP 209/11	FHJ	Heces	M	44	U311	4,5,12:i-
LSP 212/11	HUSA	Heces	H	7	U311	4,5,12:i-
LSP 214/11	HCN	Heces	M	84	DT193	4,5,12:i-
LSP 231/11	HUSA	Heces	H	41	DT195	4,12:i-
LSP 244/11	HUCA	Heces	M	7	U311	4,5,12:i-
LSP 246/11	HUCA	Heces	H	1	DT195	4,12:i-
LSP 6/12	HUCA	Sangre	H	89	RDNC	4,5,12:i-
LSP 25/12	HUCA	Heces	M	11	DT104	4,5,12:i-
LSP 31/12	HCN	Heces	H	76	DT195	4,12:i-
LSP 36/12	FHJ	Heces	M	35	DT7	4,5,12:i-
LSP 37/12	HVN	Heces	H	60	DT195	4,12:i-
LSP 39/12	FHJ	Heces	M	54	DT138	4,5,12:i-
LSP 40/12	HUC	Heces	M	53	DT104	4,12:i-
LSP 42/12	HUC	Heces	ND	1	DT195	4,12:i-
LSP 48/12	HUCA	Heces	M	11	U302	4,5,12:i-
LSP 50/12	HVN	Heces	H	28	DT138	4,5,12:i-
LSP 53/12	HUCA	Heces	H	3	RDNC	4,12:i-
LSP 54/12	HUCA	Heces	M	94	RDNC	4,12:i-
LSP 62/12	HUC	Heces	M	57	UT	4,5,12:i-
LSP 70/12	HUSA	Heces	M	3	U311	4,5,12:i-
LSP 71/12	HCN	Heces	M	79	U311	4,5,12:i-
LSP 82/12	HUC	Heces	H	15	DT138	4,5,12:i-
LSP 84/12	HUC	Heces	M	53	U311	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 97/12	HUCA	Heces	H	8	DT138	4,5,12:i-
LSP 104/12	HVN	Heces	H	5	U311	4,5,12:i-
LSP 105/12	HCN	Heces	H	58	DT104	4,5,12:i-
LSP 109/12	HUC	Heces	H	3	U311	4,12:i-
LSP 110/12	HUC	Heces	H	1	DT195	4,12:i-
LSP 117/12	HCN	Heces	M	11	DT195	4,12:i-
LSP 118/12	HCN	Heces	M	40	DT195	4,12:i-
LSP 124/12	HUC	Heces	M	27	U311	4,5,12:i-
LSP 125/12	HUC	Heces	M	14	DT138	4,5,12:i-
LSP 126/12	HUC	Heces	M	64	DT138	4,5,12:i-
LSP 127/12	HUC	Heces	H	73	U302	4,5,12:i-
LSP 130/12	HUC	Heces	M	64	DT138	4,5,12:i-
LSP 132/12	HUC	Heces	M	67	DT138	4,5,12:i-
LSP 133/12	HVN	Heces	H	5	U311	4,5,12:i-
LSP 136/12	HUSA	Heces	H	6	DT195	4,5,12:i-
LSP 144/12	HVN	Heces	H	4	DT104	4,12:i-
LSP 153/12	HUC	Heces	H	77	DT138	4,5,12:i-
LSP 154/12	HUC	Heces	M	11	DT138	4,5,12:i-
LSP 157/12	HUC	Heces	M	4	DT138	4,5,12:i-
LSP 169/12	HUCA	Heces	H	5	DT193	4,5,12:i-
LSP 175/12	HJ	Heces	M	72	RDNC	4,12:i-
LSP 177/12	FHJ	Heces	M	88	DT138	4,12:i-
LSP 197/12	HUSA	Heces	M	2	U311	4,5,12:i-
LSP 205/12	HVN	Heces	M	70	DT195	4,5,12:i-
LSP 208/12	HUC	Heces	H	79	RDNC	4,12:i-
LSP 220/12	HUCA	Heces	M	4	U311	4,5,12:i-
LSP 226/12	HUCA	Heces	M	3	RDNC	4,5,12:i-
LSP 228/12	HUCA	Heces	H	4	U311	4,5,12:i-
LSP 229/12	FHJ	Heces	M	57	U311	4,5,12:i-
LSP 233/12	HUC	Heces	H	7	DT10	4,5,12:i-
LSP 235/12	HUC	Heces	H	11	RDNC	4,5,12:i-
LSP 238/12	HUC	Heces	H	4	RDNC	4,5,12:i-
LSP 243/12	HCN	Heces	H	4	U302	4,5,12:i-
LSP 250/12	HUCA	Heces	H	2	U311	4,5,12:i-
LSP 255/12	HUSA	Heces	H	12	U302	4,5,12:i-
LSP 256/12	HUC	Heces	H	0,9	RDNC	4,5,12:i-
LSP 257/12	HUC	Heces	H	8	DT193	4,5,12:i-
LSP 258/12	HUC	Heces	M	1	RDNC	4,5,12:i-
LSP 260/12	HJ	Heces	M	88	U311	4,5,12:i-
LSP 261/12	HUC	Heces	M	10	DT138	4,5,12:i-
LSP 263/12	HUC	Heces	H	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 265/12	HVN	Heces	M	25	DT195	4,12:i-
LSP 269/12	FHJ	Heces	H	67	DT195	4,12:i-
LSP 275/12	HUCA	Sangre	H	4	DT104	4,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 276/12	HUCA	Heces	H	13	DT138	4,5,12:i-
LSP 277/12	HUCA	Heces	H	52	DT104	4,5,12:i-
LSP 4/13	HUCA	Heces	H	80	DT193	4,5,12:i-
LSP 5/13	HUCA	Heces	H	3	DT138	4,5,12:i-
LSP 6/13	HVN	Heces	H	46	DT138	4,5,12:i-
LSP 8/13	HUCA	Heces	H	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 16/13	HUC	Heces	H	7	U311	4,5,12:i-
LSP 23/13	HCN	Heces	M	92	U311	4,5,12:i-
LSP 24/13	HUC	Heces	H	5	DT8	4,5,12:i-
LSP 25/13	HUC	Heces	M	2	DT138	4,12:i-
LSP 26/13	HUC	Heces	M	8	DT7a	4,5,12:i-
LSP 27/13	HUC	Heces	M	44	DT7a	4,5,12:i-
LSP 28/13	HUC	Heces	H	12	DT7a	4,5,12:i-
LSP 31/13	HUSA	Pus	M	72	DT7a	4,5,12:i-
LSP 33/13	HUSA	Heces	H	70	UT	4,5,12:i-
LSP 35/13	HVN	Heces	H	9	DT138	4,12:i-
LSP 36/13	HUSA	Heces	H	12	DT138	4,5,12:i-
LSP 40/13	HUCA	Heces	M	33	DT120	4,12:i-
LSP 52/13	FHJ	Heces	H	81	DT18	4,5,12:i-
LSP 54/13	FHJ	Heces	M	16	DT7a	4,5,12:i-
LSP 60/13	HUSA	Heces	M	2	UT	4,12:i-
LSP 62/13	HUC	Heces	H	7	DT7a	4,5,12:i-
LSP 64/13	HUC	Heces	H	6	DT7a	4,5,12:i-
LSP 65/13	HUC	Heces	H	5	DT138	4,5,12:i-
LSP 61/13	HUC	Heces	H	4	U302	4,5,12:i-
LSP 69/13	HUSA	Heces	M	2	DT138	4,5,12:i-
LSP 71/13	HUCA	Heces	M	5	DT120	4,5,12:i-
LSP 72/13	HUCA	Heces	M	47	DT138	4,5,12:i-
LSP 96/13	HUCA	Heces	M	8	DT138	4,5,12:i-
LSP 105/13	HUC	Heces	M	62	DT22	4,5,12:i-
LSP 106/13	HUSA	Heces	M	2	U311	4,12:i-
LSP 108/13	HUSA	Heces	M	4	UT	4,12:i-
LSP 111/13	HJ	Heces	H	70	U311	4,5,12:i-
LSP 112/13	HUSA	Heces	H	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 113/13	HUSA	Heces	H	2	DT195	4,12:i-
LSP 116/13	HUCA	Heces	H	7	DT7a	4,5,12:i-
LSP 117/13	HUCA	Heces	H	3	U311	4,12:i-
LSP 123/13	HUC	Heces	M	0	DT138	4,12:i-
LSP 128/13	HUSA	Heces	H	12	DT138	4,5,12:i-
LSP 133/13	HUSA	Heces	H	7	DT138	4,12:i-
LSP 142/13	HUC	Heces	H	8	DT193	4,5,12:i-
LSP 149/13	HUC	Heces	M	2	UT	4,5,12:i-
LSP 150/13	HJ	Heces	H	66	DT195	4,12:i-
LSP 151/13	HJ	Heces	M	2	DT138	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 154/13	HUSA	Heces	M	32	DT138	4,12:i-
LSP 156/13	HJ	Heces	H	6	DT138	4,5,12:i-
LSP 168/13	HUCA	Heces	M	2	UT	4,5,12:i-
LSP 169/13	HUCA	Heces	H	64	DT193	4,5,12:i-
LSP 208/13	HUCA	Heces	M	5	DT22	4,12:i-
LSP 210/13	HUCA	Heces	H	69	DT22	4,12:i-
LSP 212/13	HUSA	Heces	H	4	DT104B	4,5,12:i-
LSP 213/13	HUSA	Heces	M	82	DT22	4,12:i-
LSP 216/13	HJ	Heces	M	6	DT193	4,12:i-
LSP 217/13	HVN	Heces	H	65	DT104B	4,5,12:i-
LSP 219/13	HUC	Heces	H	9	U311	4,5,12:i-
LSP 220/13	HUC	Heces	H	2	UT	4,5,12:i-
LSP 221/13	HUC	Heces	M	70	U311	4,5,12:i-
LSP 222/13	HUC	Heces	H	1	DT138	4,12:i-
LSP 235/13	HJ	Heces	M	15	DT138	4,12:i-
LSP 239/13	HUC	Heces	M	67	DT138	4,12:i-
LSP 240/13	HUC	Heces	M	7	U311	4,5,12:i-
LSP 241/13	HUC	Heces	H	13	U311	4,5,12:i-
LSP 242/13	HUC	Heces	H	79	DT120	4,12:i-
LSP 243/13	HUC	Heces	H	6	RDNC	4,5,12:i-
LSP 244/13	HUC	Heces	H	65	RDNC	4,12:i-
LSP 245/13	HJ	Heces	M	25	DT193	4,5,12:i-
LSP 248/13	HUC	Heces	M	13	DT138	4,12:i-
LSP 252/13	HVN	Heces	H	80	DT120	4,12:i-
LSP 259/13	HJ	Heces	M	54	U302	4,5,12:i-
LSP 260/13	HUSA	Heces	H	38	UT	4,5,12:i-
LSP 262/13	HUSA	Heces	M	9	U311	4,5,12:i-
LSP 263/13	HUSA	Heces	M	28	U311	4,5,12:i-
LSP 264/13	HUSA	Heces	H	28	U311	4,5,12:i-
LSP 271/13	HUCA	Heces	H	45	DT195	4,12:i-
LSP 272/13	HUCA	Heces	H	0,1	DT138	4,5,12:i-
LSP 276/13	HUC	Heces	H	65	DT138	4,5,12:i-
LSP 277/13	HUSA	Heces	M	44	U311	4,5,12:i-
LSP 278/13	HUCA	Heces	H	1	U311	4,5,12:i-
LSP 2/14	HUSA	Heces	M	15	DT193	4,5,12:i-
LSP 3/14	HUCA	Heces	H	8	DT138	4,5,12:i-
LSP 4/14	HCN	Heces	ND	27	DT138	4,5,12:i-
LSP 6/14	HUC	Heces	M	3	UT	4,5,12:i-
LSP 9/14	HUCA	ND	H	0,6	RDNC	4,12:i-
LSP 11/14	HUCA	Heces	H	26	DT195	4,12:i-
LSP 12/14	HCN	Heces	H	48	UT	4,5,12:i-
LSP 13/14	HUSA	Heces	H	49	DT195	4,12:i-
LSP 22/14	HUCA	Heces	M	64	DT195	4,12:i-
LSP 24/14	HUCA	Heces	H	7	RDNC	4,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 25/14	HUCA	Heces	M	6	UT	4,12:i-
LSP 29/14	HUSA	Orina	M	79	U311	4,5,12:i-
LSP 43/14	HVN	Heces	M	48	U302	4,12:i-
LSP 46/14	HCN	Heces	H	3	DT193	4,5,12:i-
LSP 47/14	HCN	Heces	M	4	DT138	4,5,12:i-
LSP 49/14	HUSA	Heces	M	81	DT138	4,5,12:i-
LSP 51/14	HUCA	Heces	H	0,3	UT	4,5,12:i-
LSP 55/14	HUCA	Heces	M	69	UT	4,5,12:i-
LSP 57/14	HUCA	ND	H	68	DT193	4,5,12:i-
LSP 60/14	HUCA	Sangre	H	47	UT	4,5,12:i-
LSP 66/14	HUC	Heces	M	10	DT138	4,5,12:i-
LSP 70/14	HUC	Heces	M	10	DT195	4,12:i-
LSP 71/14	HUC	Heces	M	1	DT193	4,12:i-
LSP 86/14	HJ	Heces	M	78	U311	4,5,12:i-
LSP 89/14	HUCA	Heces	M	13	U311	4,5,12:i-
LSP 90/14	HUCA	Heces	H	2	UT	4,5,12:i-
LSP 91/14	HUCA	Heces	m	4	DT193	4,5,12:i-
LSP 92/14	HUCA	Heces	H	58	DT138	4,5,12:i-
LSP 97/14	HUSA	Heces	h	34	DT56	4,12:i-
LSP 120/14	HJ	Heces	M	77	DT193	4,5,12:i-
LSP 127/14	HUC	Heces	H	63	RDNC	4,5,12:i-
LSP 144/14	HUSA	Orina	M	65	DT138	4,5,12:i-
LSP 145/14	HUSA	ND	H	72	DT138	4,5,12:i-
LSP 148/14	HVN	Heces	H	38	UT	4,12:i-
LSP 150/14	HVN	Heces	M	6	DT193	4,12:i-
LSP 158/14	HCN	Heces	M	1	DT138	4,12:i-
LSP 176/14	HCN	Heces	M	66	DT195	4,12:i-
LSP 178/14	HUSA	Heces	H	66	DT138	4,12:i-
LSP 181/14	HJ	Heces	M	35	U302	4,12:i-
LSP 190/14	HVN	Heces	H	62	DT138	4,12:i-
LSP 195/14	HUC	Heces	H	3	U311	4,12:i-
LSP 197/14	HUC	Heces	M	1	DT18	4,5,12:i-
LSP 202/14	HUCA	Heces	H	6	DT138	4,5,12:i-
LSP 204/14	HUCA	Heces	H	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 214/14	HJ	Heces	H	74	DT138	4,12:i-
LSP 215/14	HVN	Heces	H	23	DT138	4,12:i-
LSP 216/14	HUSA	Heces	M	83	DT138	4,12:i-
LSP 219/14	HUSA	Heces	M	8	DT138	4,12:i-
LSP 227/14	HUC	Heces	H	2	DT104B	4,12:i-
LSP 228/14	HUC	Heces	H	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 232/14	HUC	Heces	H	2	DT138	4,12:i-
LSP 234/14	HUCA	Sangre	H	83	DT138	4,5,12:i-
LSP 236/14	HUCA	Heces	M	11	DT193	4,5,12:i-
LSP 239/14	HUCA	Heces	H	4	DT138	4,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 240/14	HUCA	Heces	M	12	DT138	4,12:i-
LSP 258/14	HCN	Heces	M	65	DT195	4,12:i-
LSP 262/14	HVN	Heces	M	7	DT138	4,5,12:i-
LSP 265/14	HUCA	Heces	M	64	RDNC	4,12:i-
LSP 268/14	HUCA	Heces	H	5	RDNC	4,12:i-
LSP 269/14	HUCA	Heces	H	25	RDNC	4,5,12:i-
LSP 270/14	HUCA	Heces	M	2	RDNC	4,5,12:i-
LSP 288/14	HUCA	Heces	H	1	DT138	4,12:i-
LSP 290/14	HUCA	Heces	H	6	DT193	4,12:i-
LSP 321/14	HUSA	Heces	H	13	DT22	4,5,12:i-
LSP 325/14	HUCA	Heces	M	6	RDNC	4,12:i-
LSP 358/14	FHJ	Heces	H	47	DT138	4,12:i-
LSP 360/14	HUSA	Heces	H	7	UT	4,5,12:i-
LSP 375/14	HUCA	Heces	H	9	DT193	4,5,12:i-
LSP 397/14	HVN	Heces	M	5	RDNC	4,5,12:i-
LSP 416/14	HUCA	Heces	M	4	DT195	4,12:i-
LSP 433/14	HUCA	Heces	H	1	DT138	4,12:i-
LSP 438/14	HUSA	Heces	H	2	DT138	4,5,12:i-
LSP 459/14	HUCA	Heces	M	2	DT138	4,12:i-
LSP 640/14	HUCA	Heces	M	2	DT138	4,12:i-
LSP 462/14	HUCA	Heces	H	5	DT138	4,12:i-
LSP 470/14	HUSA	Heces	H	68	DT138	4,12:i-
LSP 471/14	HUSA	Heces	H	14	DT138	4,12:i-
LSP 472/14	HUSA	Heces	H	87	DT138	4,12:i-
LSP 473/14	HUSA	Heces	M	61	DT138	4,12:i-
LSP 474/14	HUSA	Heces	H	56	U302	4,5,12:i-
LSP 479/14	HUCA	Heces	H	5	DT138	4,12:i-
LSP 480/14	HUCA	Heces	M	6	RDNC	4,12:i-
LSP 487/14	HUCA	Heces	H	7	DT193	4,12:i-
LSP 494/14	HUC	Heces	M	1	DT195	4,12:i-
LSP 500/14	HJ	Heces	M	3	DT104B	4,5,12:i-
LSP 508/14	HUCA	Heces	M	5	U311	4,5,12:i-
LSP 514/14	HUSA	Heces	H	0,1	DT138	4,12:i-
LSP 517/14	HUC	Heces	M	10	U311	4,5,12:i-
LSP 518/14	HUC	Heces	H	17	DT195	4,12:i-
LSP 524/14	HUCA	Heces	H	83	DT193	4,5,12:i-
LSP 530/14	HUCA	Heces	H	29	DT104B	4,12:i-
LSP 533/14	HJ	Heces	H	57	UT	4,5,12:i-
LSP 535/14	HUCA	Heces	M	82	DT193	4,12:i-
LSP 537/14	HUCA	Heces	M	6	RDNC	4,12:i-
LSP 543/14	HUSA	Heces	M	8	DT104B	4,12:i-
LSP 2/15	HUSA	Heces	H	75	UT	4,5,12:i-
LSP 4/15	HUSA	Heces	H	24	UT	4,5,12:i-
LSP 5/15	HUC	Heces	M	3	U302	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 6/15	HUC	Heces	M	2	U311	4,5,12:i-
LSP 7/15	HUC	Heces	M	4	UT	4,5,12:i-
LSP 8/15	HUC	Heces	M	6	DT208	4,5,12:i-
LSP 10/15	HUSA	Heces	H	15	DT138	4,12:i-
LSP 11/15	HUSA	Heces	H	67	UT	4,5,12:i-
LSP 12/15	HUSA	Heces	H	52	RDNC	4,5,12:i-
LSP 21/15	HUCA	Heces	H	8	U311	4,5,12:i-
LSP 24/15	HUSA	Heces	H	33	DT193	4,5,12:i-
LSP 25/15	FHJ	Heces	H	51	DT22	4,5,12:i-
LSP 27/15	HVN	Heces	H	67	DT22	4,5,12:i-
LSP 42/15	HUSA	Heces	H	6	DT22	4,12:i-
LSP 44/15	FHJ	Heces	M	86	DT120	4,12:i-
LSP 46/15	HA	Heces	M	2	RDNC	4,5,12:i-
LSP 48/15	HUCA	Heces	H	7	DT120	4,5,12:i-
LSP 49/15	HUCA	Heces	H	55	RDNC	4,5,12:i-
LSP 53/15	HUCA	Heces	H	7	DT120	4,5,12:i-
LSP 64/15	FHJ	Heces	M	56	RDNC	4,5,12:i-
LSP 65/15	HA	Heces	H	4	UT	4,5,12:i-
LSP 68/15	HUCA	Heces	H	12	DT120	4,5,12:i-
LSP 71/15	HUCA	Heces	M	9	RDNC	4,5,12:i-
LSP 84/15	HUSA	Heces	H	42	DT138	4,12:i-
LSP 86/15	HUSA	Heces	M	37	DT138	4,12:i-
LSP 88/15	HUSA	Heces	H	6	U323	4,12:i-
LSP 92/15	HUC	Heces	H	3	DT138	4,5,12:i-
LSP 95/15	HUC	Heces	H	66	RDNC	4,5,12:i-
LSP 96/15	HUSA	Heces	M	10	DT138	4,5,12:i-
LSP 97/15	HUSA	Heces	M	83	DT138	4,5,12:i-
LSP 99/15	HUSA	Heces	M	20	DT138	4,5,12:i-
LSP 106/15	HUCA	Heces	M	0,1	DT195	4,5,12:i-
LSP 107/15	HUCA	Heces	M	13	DT193	4,5,12:i-
LSP 113/15	HUC	Heces	M	1	DT138	4,12:i-
LSP 149/15	HUCA	Heces	M	11	U302	4,5,12:i-
LSP 159/15	HUC	Heces	M	5	U311	4,5,12:i-
LSP 161/15	HVN	Heces	H	4	U311	4,5,12:i-
LSP 162/15	HA	Heces	M	76	RDNC	4,5,12:i-
LSP 165/15	HVN	Heces	H	4	U311	4,5,12:i-
LSP 167/15	HJ	Heces	H	38	U311	4,5,12:i-
LSP 168/15	HUSA	Heces	M	24	DT120	4,12:i-
LSP 169/15	HUSA	Heces	H	64	DT138	4,12:i-
LSP 172/15	HUSA	Heces	H	76	RDNC	4,5,12:i-
LSP 175/15	HUCA	Heces	M	33	DT138	4,12:i-
LSP 186/15	HUC	Heces	M	5	U311	4,5,12:i-
LSP 192/15	HCN	Heces	H	77	DT138	4,12:i-
LSP 206/15	HUSA	Heces	H	86	DT193	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 212/15	HJ	Heces	H	8	DT104B	4,5,12:i-
LSP 213/15	HVN	Heces	H	1	DT22	4,5,12:i-
LSP 221/15	HUCA	Heces	H	64	RDNC	4,5,12:i-
LSP 239/15	FHJ	Heces	M	80	DT138	4,5,12:i-
LSP 246/15	HUC	Heces	H	56	DT120	4,5,12:i-
LSP 250/15	HUCA	Heces	H	75	RDNC	4,5,12:i-
LSP 255/15	HUCA	Heces	M	70	RDNC	4,5,12:i-
LSP 258/15	HUCA	Heces	M	12	DT104B	4,5,12:i-
LSP 259/15	HUCA	Heces	M	6	DT193	4,5,12:i-
LSP 261/15	HUCA	Heces	H	7	DT120	4,12:i-
LSP 262/15	HUCA	Heces	H	65	DT120	4,5,12:i-
LSP 263/15	HUCA	Heces	H	71	DT195	4,5,12:i-
LSP 266/15	HVN	Heces	H	56	DT120	4,5,12:i-
LSP 267/15	HUSA	Heces	H	22	DT193	4,5,12:i-
LSP 268/15	HUSA	Heces	H	9	DT193	4,12:i-
LSP 270/15	HUSA	Heces	H	42	DT120	4,5,12:i-
LSP 275/15	CA	Heces	H	31	RDNC	4,12:i-
LSP 276/15	HVN	Heces	M	86	DT104B	4,5,12:i-
LSP 277/15	HVN	Heces	M	8	RDNC	4,12:i-
LSP 289/15	HUC	Heces	H	75	RDNC	4,5,12:i-
LSP 300/15	HVN	Heces	H	37	DT104B	4,5,12:i-
LSP 306/15	HUCA	Heces	H	5	RDNC	4,12:i-
LSP 307/15	HUCA	Heces	H	9	U311	4,5,12:i-
LSP 309/15	HUCA	Heces	M	79	RDNC	4,5,12:i-
LSP 312/15	FHJ	Heces	M	27	RDNC	4,5,12:i-
LSP 325/15	HUCA	Heces	M	7	DT193	4,5,12:i-
LSP 328/15	HUCA	Heces	M	8	DT193	4,5,12:i-
LSP 340/15	HUC	Heces	H	13	RDNC	4,12:i-
LSP 342/15	HUC	Heces	M	24	RDNC	4,5,12:i-
LSP 346/15	HUC	Heces	M	5	RDNC	4,5,12:i-
LSP 363/15	HVN	Heces	H	0	DT104	4,5,12:i-
LSP 365/15	HUSA	Heces	M	4	DT104B	4,12:i-
LSP 369/15	HUSA	Heces	M	1	DT138	4,5,12:i-
LSP 370/15	HUSA	Heces	H	2	DT138	4,5,12:i-
LSP 380/15	HUCA	Heces	H	68	DT120	4,12:i-
LSP 382/15	HVN	Heces	H	77	DT193	4,12:i-
LSP 387/15	FHJ	Heces	H	74	RDNC	4,5,12:i-
LSP 402/15	HVN	Heces	H	4	DT193	4,12:i-
LSP 425/15	HUCA	Heces	H	7	RDNC	4,5,12:i-
LSP 434/15	HJ	Orina	M	82	DT138	4,5,12:i-
LSP 435/15	HUCA	Heces	M	9	DT138	4,5,12:i-
LSP 436/15	HUCA	Heces	H	12	RDNC	4,5,12:i-
LSP 438/15	HUCA	Heces	H	52	U302	4,5,12:i-
LSP 440/15	HUCA	Heces	H	4	DT104B	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 442/15	HUCA	Heces	M	11	U311	4,5,12:i-
LSP 443/15	HUCA	Heces	H	0,7	RDNC	4,5,12:i-
LSP 452/15	HJ	Heces	M	82	DT138	4,5,12:i-
LSP 453/15	HVN	Heces	H	44	U311	4,5,12:i-
LSP 459/15	HA	Heces	H	41	RDNC	4,12:i-
LSP 462/15	HJ	Heces	H	72	RDNC	4,5,12:i-
LSP 465/15	HUSA	Heces	H	65	U311	4,5,12:i-
LSP 469/15	HUSA	Heces	H	4	RDNC	4,12:i-
LSP 471/15	HUSA	Heces	M	54	DT195	4,5,12:i-
LSP 473/15	HVN	Heces	H	4	DT193	4,12:i-
LSP 476/15	HUC	Heces	M	1	UT	4,5,12:i-
LSP 480/15	HUCA	Heces	H	3	DT138	4,12:i-
LSP 481/15	HUCA	Heces	M	9	DT138	4,5,12:i-
LSP 490/15	HUCA	Heces	M	6	DT138	4,5,12:i-
LSP 1/16	FHJ	Heces	H	69	DT138	4,12:i-
LSP 3/16	HVN	Heces	M	5	DT120	4,5,12:i-
LSP 8/16	HUCA	Heces	H	2	DT120	4,12:i-
LSP 13/16	HUC	Heces	M	27	RDNC	4,5,12:i-
LSP 16/16	CA	Heces	H	7	U311	4,5,12:i-
LSP 19/16	HCN	Heces	M	87	RDNC	4,5,12:i-
LSP 22/16	HVN	Heces	H	13	RDNC	4,12:i-
LSP 30/16	HUCA	Heces	H	6	DT138	4,12:i-
LSP 42/16	HUC	Heces	M	10	DT138	4,12:i-
LSP 43/16	HUC	Heces	H	9	DT120	4,12:i-
LSP 53/16	HVN	Heces	H	2	DT104	4,5,12:i-
LSP 54/16	HVN	Heces	M	6	RDNC	4,5,12:i-
LSP 56/16	HUCA	Heces	H	11	DT120	4,5,12:i-
LSP 61/16	HUCA	Heces	H	85	RDNC	4,12:i-
LSP 62/16	HUCA	Sangre	H	69	RDNC	4,12:i-
LSP 65/16	HUC	Heces	H	78	DT138	4,5,12:i-
LSP 67/16	HUC	Heces	M	54	DT138	4,5,12:i-
LSP 68/16	HUC	Heces	M	0,4	DT195	4,5,12:i-
LSP 80/16	HVN	Heces	M	3	RDNC	4,5,12:i-
LSP 96/16	HUSA	Heces	M	65	RDNC	4,12:i-
LSP 106/16	HUSA	Heces	H	12	UT	4,12:i-
LSP 109/16	HUSA	Heces	M	7	DT195	4,12:i-
LSP 111/16	HUSA	Heces	H	20	DT193	4,5,12:i-
LSP 119/16	HUCA	Heces	M	9	RDNC	4,5,12:i-
LSP 123/16	HUSA	Heces	M	59	DT22	4,5,12:i-
LSP 124/16	HUSA	Heces	H	15	DT193	4,5,12:i-
LSP 134/16	HUC	Heces	M	55	DT120	4,5,12:i-
LSP 136/16	HUC	Heces	M	11	U311	4,5,12:i-
LSP 144/16	HUSA	Heces	M	9	RDNC	4,5,12:i-
LSP 145/16	HUSA	Heces	M	63	DT193	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP	149/16	HUSA	Pus	H	58	DT193	4,12:i-
LSP	152/16	HUCA	Heces	H	8	RDNC	4,5,12:i-
LSP	157/16	HUCA	Sangre	H	90	DT138	4,12:i-
LSP	160/16	HUCA	Heces	H	76	DT138	4,5,12:i-
LSP	169/16	HJ	Heces	M	23	RDNC	4,12:i-
LSP	171/16	HUCA	Heces	H	0,1	DT120	4,12:i-
LSP	195/16	HUC	Heces	H	11	RDNC	4,12:i-
LSP	199/16	FHJ	Heces	M	15	DT195	4,12:i-
LSP	206/16	HUSA	Heces	H	4	DT120	4,12:i-
LSP	209/16	HUSA	Heces	M	1	DT193	4,5,12:i-
LSP	211/16	HA	Heces	M	22	DT22	4,12:i-
LSP	220/16	HUCA	Heces	H	7	DT104	4,12:i-
LSP	226/16	HCN	Heces	H	7	DT104B	4,12:i-
LSP	227/16	FHJ	Heces	H	20	U311	4,12:i-
LSP	228/16	HUC	Heces	H	78	UT	4,5,12:i-
LSP	229/16	HUC	Heces	H	6	DT104	4,12:i-
LSP	235/16	HUC	Heces	M	0,3	U311	4,5,12:i-
LSP	236/16	HUSA	Heces	H	8	DT195	4,12:i-
LSP	237/16	HUSA	Heces	H	55	RDNC	4,5,12:i-
LSP	242/16	HUSA	Heces	M	32	RDNC	4,12:i-
LSP	252/16	HUCA	Heces	H	89	DT193	4,12:i-
LSP	276/16	HUC	Heces	H	8	DT120	4,12:i-
LSP	286/16	HUCA	Heces	H	72	UT	4,12:i-
LSP	287/16	HUCA	Heces	M	91	DT120	4,12:i-
LSP	289/16	HUCA	Heces	ND	5	DT120	4,12:i-
LSP	304/16	HUSA	Heces	H	4	U302	4,12:i-
LSP	306/16	HUSA	Heces	M	11	U302	4,12:i-
LSP	311/16	HUCA	Heces	H	73	DT104B	4,12:i-
LSP	368/16	HUSA	Heces	M	84	RDNC	4,5,12:i-
LSP	374/16	HUC	Heces	M	2	DT193	4,5,12:i-
LSP	393/16	FHJ	Orina	M	83	DT195	4,5,12:i-
LSP	398/16	HUCA	Heces	H	4	RDNC	4,5,12:i-
LSP	404/16	HUCA	Heces	M	3	ND	4,5,12:i-
LSP	424/16	HUSA	Heces	M	85	RDNC	4,5,12:i-
LSP	435/16	HA	Sangre	H	66	DT120	4,5,12:i-
LSP	447/16	HUC	Heces	H	48	RDNC	4,5,12:i-
LSP	452/16	HUC	Heces	H	51	UT	4,5,12:i-
LSP	461/16	HVN	Heces	H	67	DT193	4,5,12:i-
LSP	475/16	HUSA	Heces	M	75	UT	4,5,12:i-
LSP	486/16	HUCA	Heces	M	55	UT	4,5,12:i-
LSP	489/16	HUCA	Heces	M	9	RDNC	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 490/16	FHJ	Heces	H	58	DT104B	4,5,12:i-
LSP 492/16	HUCA	Heces	M	22	U311	4,5,12:i-
LSP 499/16	HUCA	Heces	M	8	UT	4,5,12:i-
LSP 509/16	HUCA	Heces	H	53	DT195	4,5,12:i-
LSP 521/16	HUSA	Heces	M	16	DT193	4,5,12:i-
LSP 522/16	HUSA	Heces	M	57	DT193	4,5,12:i-
LSP 525/16	HUC	Heces	M	66	DT193	4,12:i-
LSP 532/16	HUC	Heces	H	12	DT120	4,5,12:i-
LSP 538/16	HUCA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 539/16	HUCA	Heces	H	78	ND	4,5,12:i-
LSP 547/16	HUCA	Heces	M	3	ND	4,5,12:i-
LSP 547/16	HUCA	Heces	M	5	ND	4,5,12:i-
LSP 547/16	HUSA	Heces	H	31	ND	4,5,12:i-
LSP 1/17	HUCA	Heces	M	68	ND	4,12:i-
LSP 3/17	HJ	Heces	M	1	ND	4,5,12:i-
LSP 5/17	HUSA	Heces	M	2	ND	4,5,12:i-
LSP 6/17	HUC	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-
LSP 10/17	HUC	Heces	H	4	ND	4,5,12:i-
LSP 13/17	HCN	Heces	H	12	ND	4,5,12:i-
LSP 14/17	HCN	Heces	M	39	ND	4,5,12:i-
LSP 17/17	HA	Heces	H	64	ND	4,5,12:i-
LSP 26/17	HUCA	Heces	M	7	ND	4,5,12:i-
LSP 29/17	HUSA	Heces	H	11	ND	4,5,12:i-
LSP 34/17	HCN	Heces	M	36	ND	4,5,12:i-
LSP 37/17	HUCA	Heces	M	64	ND	4,5,12:i-
LSP 41/17	HUCA	Heces	H	22	ND	4,5,12:i-
LSP 50/17	HUCA	Heces	M	72	ND	4,5,12:i-
LSP 51/17	HUCA	ND	H	78	ND	4,5,12:i-
LSP 53/17	HUCA	Heces	H	7	ND	4,12:i-
LSP 54/17	HUCA	ND	M	7	ND	4,5,12:i-
LSP 56/17	HUCA	Orina	M	74	ND	4,5,12:i-
LSP 57/17	HVN	Heces	M	8	ND	4,5,12:i-
LSP 60/17	HUC	Heces	H	39	ND	4,5,12:i-
LSP 65/17	HUC	Heces	H	59	ND	4,5,12:i-
LSP 70/17	HUSA	Heces	H	10	ND	4,5,12:i-
LSP 83/17	HUCA	Heces	H	8	ND	4,5,12:i-
LSP 85/17	HUSA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 86/17	HUSA	Heces	H	8	ND	4,5,12:i-
LSP 90/17	HCN	Heces	H	2	ND	4,5,12:i-
LSP 92/17	HUSA	Heces	H	8	ND	4,5,12:i-
LSP 100/17	HUC	Heces	M	8	ND	4,5,12:i-
LSP 102/17	HUC	Heces	M	1	ND	4,5,12:i-
LSP 110/17	HUCA	Heces	M	23	ND	4,5,12:i-

(continuación Anexo I)

LSP 115/17	HUCA	Heces	M	12	ND	4,5,12:i-
LSP 116/17	HUCA	Heces	H	24	ND	4,5,12:i-
LSP 119/17	HA	Heces	M	23	ND	4,5,12:i-
LSP 120/17	HVN	Orina	M	18	ND	4,5,12:i-
LSP 132/17	HUC	Heces	H	2	ND	4,5,12:i-
LSP 139/17	HUSA	Heces	M	74	ND	4,5,12:i-
LSP 144/17	HUSA	Heces	M	8	ND	4,5,12:i-
LSP 149/17	HUCA	Heces	M	81	ND	4,5,12:i-
LSP 154/17	HUCA	Heces	H	4	ND	4,5,12:i-
LSP 157/17	HUC	Heces	H	69	ND	4,5,12:i-
LSP 160/17	HVN	Heces	M	3	ND	4,5,12:i-
LSP 164/17	HCN	Heces	H	20	ND	4,5,12:i-
LSP 167/17	HVN	Heces	H	68	ND	4,5,12:i-
LSP 168/17	HJ	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 170/17	HUCA	Heces	M	11	ND	4,5,12:i-
LSP 173/17	HUCA	Heces	M	2	ND	4,5,12:i-
LSP 177/17	HUCA	Heces	H	65	ND	4,5,12:i-
LSP 179/17	HUCA	Heces	M	3	ND	4,5,12:i-
LSP 182/17	HUSA	Heces	H	5	ND	4,5,12:i-
LSP 190/17	FHJ	Heces	M	18	ND	4,5,12:i-
LSP 193/17	HUC	Heces	H	4	ND	4,5,12:i-
LSP 194/17	HUC	Heces	M	15	ND	4,5,12:i-
LSP 205/17	HUSA	Heces	H	70	ND	4,5,12:i-
LSP 207/17	HUSA	Heces	H	5	ND	4,5,12:i-
LSP 208/17	HUSA	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-
LSP 227/17	HCN	Heces	M	8	ND	4,5,12:i-
LSP 233/17	HUSA	Heces	H	6	ND	4,5,12:i-
LSP 237/17	FHJ	Heces	M	26	ND	4,5,12:i-
LSP 247/17	HVN	Heces	H	4	ND	4,5,12:i-
LSP 248/17	HJ	Heces	M	69	ND	4,5,12:i-
LSP 252/17	HUCA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 254/17	HUCA	Heces	M	18	ND	4,5,12:i-
LSP 255/17	HUCA	Heces	H	0,8	ND	4,5,12:i-
LSP 256/17	HUCA	Sangre	M	0,9	ND	4,5,12:i-
LSP 258/17	HUCA	Heces	M	15	ND	4,5,12:i-
LSP 259/17	HUCA	Heces	M	0,9	ND	4,5,12:i-
LSP 264/17	HUSA	Heces	M	2	ND	4,5,12:i-
LSP 269/17	HCN	Heces	H	6	ND	4,5,12:i-
LSP 270/17	HCN	Heces	M	41	ND	4,5,12:i-
LSP 272/17	HUCA	Heces	M	1	ND	4,5,12:i-
LSP 274/17	HUCA	Heces	H	76	ND	4,5,12:i-
LSP 276/17	HUCA	Heces	H	30	ND	4,5,12:i-
LSP 277/17	HUCA	Heces	H	6	ND	4,5,12:i-
LSP 278/17	HUCA	Heces	H	45	ND	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 280/17	HUCA	Heces	H	62	ND	4,5,12:i-
LSP 281/17	HVN	Heces	M	55	ND	4,5,12:i-
LSP 282/17	HVN	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 283/17	FHJ	Heces	H	73	ND	4,5,12:i-
LSP 284/17	HUSA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 286/17	HUSA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 287/17	HUSA	Heces	H	5	ND	4,5,12:i-
LSP 297/17	HUC	Heces	H	87	ND	4,5,12:i-
LSP 298/17	HUC	Heces	H	78	ND	4,5,12:i-
LSP 299/17	HUC	Heces	H	71	ND	4,5,12:i-
LSP 300/17	HUC	Heces	H	7	ND	4,5,12:i-
LSP 302/17	HUC	Heces	M	45	ND	4,5,12:i-
LSP 304/17	HUSA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 307/17	HJ	Heces	M	68	ND	4,5,12:i-
LSP 310/17	HUSA	Heces	H	104	ND	4,5,12:i-
LSP 319/17	HUCA	Heces	H	74	ND	4,5,12:i-
LSP 320/17	HUCA	Heces	M	7	ND	4,5,12:i-
LSP 323/17	HUCA	Heces	M	2	ND	4,5,12:i-
LSP 324/17	HUCA	Heces	H	32	ND	4,5,12:i-
LSP 327/17	HUCA	Heces	H	8	ND	4,5,12:i-
LSP 328/17	HJ	Heces	M	1	ND	4,5,12:i-
LSP 331/17	HUSA	Heces	M	41	ND	4,5,12:i-
LSP 332/17	HUSA	Heces	H	12	ND	4,5,12:i-
LSP 5/18	HUSA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 6/18	HUSA	Heces	H	28	ND	4,5,12:i-
LSP 11/18	HVN	Heces	M	5	ND	4,5,12:i-
LSP 13/18	HVN	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-
LSP 14/18	HVN	Heces	H	70	ND	4,5,12:i-
LSP 21/18	HUCA	Orina	M	74	ND	4,5,12:i-
LSP 22/18	HUCA	Heces	M	63	ND	4,12:i-
LSP 25/18	HUCA	Heces	H	7	ND	4,5,12:i-
LSP 26/18	HUCA	Heces	M	7	ND	4,5,12:i-
LSP 27/18	HUCA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 35/18	HUSA	Heces	M	3	ND	4,5,12:i-
LSP 44/18	HUSA	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 47/18	HUSA	Heces	M	10	ND	4,12:i-
LSP 48/18	HUSA	Heces	H	12	ND	4,12:i-
LSP 49/18	HVN	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 50/18	HUSA	Heces	M	1	ND	4,12:i-
LSP 51/18	HUSA	Heces	H	10	ND	4,5,12:i-
LSP 53/18	HUC	Orina	M	71	ND	4,5,12:i-
LSP 54/18	HUC	Heces	M	70	ND	4,5,12:i-
LSP 55/18	HUC	Heces	M	37	ND	4,5,12:i-
LSP 56/18	HUC	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 61/18	HUCA	Heces	M	8	ND	4,5,12:i-
LSP 64/18	HUCA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 65/18	HUCA	Heces	H	12	ND	4,5,12:i-
LSP 66/18	HUCA	Heces	H	76	ND	4,5,12:i-
LSP 67/18	HUSA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 69/18	HA	Heces	M	71	ND	4,5,12:i-
LSP 73/18	HUSA	Heces	M	50	ND	4,5,12:i-
LSP 74/18	HCN	Heces	H	20	ND	4,5,12:i-
LSP 76/18	HUSA	Heces	M	72	ND	4,12:i-
LSP 79/18	HUSA	Heces	M	7	ND	4,12:i-
LSP 80/18	HUSA	Heces	M	2	ND	4,5,12:i-
LSP 81/18	HUSA	Heces	M	9	ND	4,5,12:i-
LSP 83/18	HCN	Heces	M	89	ND	4,5,12:i-
LSP 84/18	HVN	Heces	H	10	ND	4,5,12:i-
LSP 86/18	HUCA	Heces	H	12	ND	4,5,12:i-
LSP 93/18	HUCA	Heces	M	6	ND	4,5,12:i-
LSP 94/18	HUCA	Heces	H	66	ND	4,5,12:i-
LSP 98/18	HCN	Heces	H	94	ND	4,5,12:i-
LSP 102/18	FHJ	Heces	H	52	ND	4,5,12:i-
LSP 104/18	HUC	Heces	H	11	ND	4,5,12:i-
LSP 110/18	HCN	Heces	M	82	ND	4,5,12:i-
LSP 112/18	HCN	Orina	M	82	ND	4,5,12:i-
LSP 113/18	HUSA	Heces	H	13	ND	4,5,12:i-
LSP 114/18	HUSA	Heces	H	18	ND	4,5,12:i-
LSP 121/18	HVN	Heces	H	2	ND	4,5,12:i-
LSP 122/18	FHJ	Heces	H	ND	ND	4,5,12:i-
LSP 123/18	HCN	Heces	H	75	ND	4,5,12:i-
LSP 126/18	HUSA	Heces	H	9	ND	4,5,12:i-
LSP 127/18	HJ	Heces	H	0,1	ND	4,5,12:i-
LSP 129/18	HUCA	Heces	H	66	ND	4,5,12:i-
LSP 131/18	HUCA	Heces	H	82	ND	4,5,12:i-
LSP 132/18	HUCA	Heces	M	63	ND	4,5,12:i-
LSP 133/18	HUCA	Heces	H	68	ND	4,5,12:i-
LSP 134/18	HUCA	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-
LSP 137/18	HUC	Heces	M	ND	ND	4,5,12:i-
LSP 138/18	HUC	Heces	H	5	ND	4,5,12:i-
LSP 140/18	HUC	Heces	H	6	ND	4,5,12:i-
LSP 143/18	FHJ	Heces	M	76	ND	4,5,12:i-
LSP 147/18	HUSA	Heces	M	ND	ND	4,5,12:i-
LSP 148/18	HUSA	Heces	M	ND	ND	4,5,12:i-
LSP 155/18	HUC	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 159/18	HUCA	Heces	M	18	ND	4,5,12:i-
LSP 160/18	HUCA	Heces	H	2	ND	4,5,12:i-
LSP 161/18	HUCA	Heces	H	18	ND	4,5,12:i-

(Continuación Anexo I)

LSP 165/18	HUCA	Heces	M	11	ND	4,5,12:i-
LSP 168/18	HJ	Heces	M	59	ND	4,5,12:i-
LSP 174/18	HJ	Heces	M	82	ND	4,5,12:i-
LSP 182/18	HUSA	Heces	H	9	ND	4,5,12:i-
LSP 188/18	HUCA	Heces	M	10	ND	4,5,12:i-
LSP 189/18	HUCA	Heces	M	0,3	ND	4,5,12:i-
LSP 190/18	HUCA	Heces	M	0,3	ND	4,5,12:i-
LSP 192/18	HVN	Heces	H	3	ND	4,5,12:i-
LSP 194/18	HVN	Heces	M	15	ND	4,5,12:i-
LSP 197/18	HUCA	Heces	H	59	ND	4,5,12:i-
LSP 200/18	HUCA	Heces	H	1	ND	4,5,12:i-
LSP 201/18	HUCA	Heces	H	2	ND	4,5,12:i-
LSP 208/18	HUC	Heces	H	14	ND	4,5,12:i-
LSP 210/18	HUCA	Orina	M	82	ND	ND
HUCA 20174600	HUCA	Hemocultivo	H	71	ND	ND
HUCA 20475219	HUCA	Aspirado traqueal	H	71	ND	ND
HUCA 20475222	HUCA	Hemocultivo	H	71	ND	ND
HUCA 248014172	HUCA	Heces	H	71	ND	ND

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública; HUCA; Hospital Universitario Central de Asturias.

b, CA, Clínica Asturias; HMN, Hospital Monte Naranco; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; HUC; Hospital Universitario de Cabueñes; HCN, Hospital Cangas de Narcea; HVN, Hospital Valle del Nalón; ISN, Instituto Nacional de Silicosis; HJ, Hospital de Jario; HA, Hospital de Arriondas. FHJ, Hospital Fundación Jove; HUSA, Hospital Universitario San Agustín. HMN, Hospital Monte Naranco.

c, Sexo: H, hombre; M, mujer; nd, no determinado.

d, DT, "Definite Type"; RNDC, "Reaction but Did Not Conform"; UT, "UnTypeable", ND, no determinado.

e, ND, no determinado.

Anexo II. Aislamientos de origen clínico pertenecientes a diferentes serotipos con resistencias emergentes detectados en hospitales de País Vasco y Cantabria.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Origen	Paciente ^c		Serotipo
			Sexo	Edad	
HUD 1/09	HUD	Heces	M	35	Kentucky
HUD 2/09	HUD	Heces	M	2	Kentucky
HUD 3/09	HUD	Heces	M	1	Enteritidis
HUD 1/12	HUD	Heces	H	5	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 2/12	HUD	Heces	M	10	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 3/12	HUD	Heces	H	9	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 4/12	HUD	Heces	M	51	Bredeney
HUD 1/13	HUD	Heces	H	2	Kentucky
HUD 2/14	HUD	Heces	M	78	Variante monofásica 4,[5],12:i-

(Continuación Anexo II)

HUD_3_14	HUD	Heces	M	3	Typhimurium
HUD 1/14	HUD	Heces	H	33	Kentucky
HUD 1/15	HUD	Heces	H	40	Kentucky
HUD_2_15	HUD	Heces	H	6	Typhimurium
HUD 3/15	HUD	Heces	H	3	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 1/16	HUD	Heces	M	9	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 2/16	HUD	Heces	H	8	Variante monofásica 4,[5],12:i-
HUD 1/17	HUD	Heces	M	34	Kentucky
HUA 5/18	HUA	Heces	M	53	Corvallis
HUA 6/18	HUA	Heces	M	6	Corvallis
HUA 3/18	HUA	Heces	M	25	Kentucky
HUA 10/18	HUA	Heces	M	37	Kentucky
HUMV 1/13	HUMV	Heces	M	7	Infantis
HUMV 1/15	HUMV	Heces	M	4	Infantis
HUMV 1/16	HUMV	Heces	M	16	Paratyphi B
HUMV 1/18	HUMV	Heces	M	70	Bredeney

a, b, HUD, Hospital Universitario de Donostia; HUA, Hospital Universitario de Álava; HUMV, Hospital Universitario Marqués de Valdecillas.

c, Sexo: H, Hombre; M, mujer.

Anexo III. Aislamientos de origen clínico pertenecientes a diferentes serotipos con resistencias emergentes detectados en el Principado de Asturias durante el periodo 2008-2018.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Origen	Paciente ^c		Serotipo
			Sexo	Edad	
LSP 213/09	HUCA	Exudado de herida	M	59	Kentucky
LSP 150/10	HUC	Heces	M	21	Kentucky
LSP 105/15	HUCA	Heces	H	1	Kentucky
LSP 235/17	HUSA	Heces	H	74	Kentucky
LSP 314/17	HUSA	Heces	M	32	Kentucky
LSP 273/16	HCN	Heces	M	96	Corvallis
LSP 52/17	HUCA	Heces	H	48	Corvallis
LSP 55/17	HUCA	Heces	M	71	Corvallis
LSP 177/18	HUC	Heces	H	84	Corvallis
LSP 195/18	HUCA	úlceras cutánea	H	60	Corvallis
LSP 199/18	HUCA	Heces	H	60	Corvallis
LSP 35/08	HUCA	Heces	H	0,5	Bredeney
LSP 147/10	HUC	Heces	H	2	Bredeney
LSP 253/10	HUC	Heces	M	10	Bredeney
LSP 174/11	HUC	nd	H	67	Bredeney
LSP 114/12	HJ	Heces	H	67	Bredeney
LSP 245/12	HUCA	Heces	M	1	Bredeney
LSP 477/14	HA	Heces	M	60	Bredeney

(Continuación Anexo II)

LSP 497/14	HUC	Heces	H	51	Bredeney
LSP 499/14	HA	Heces	H	45	Bredeney
LSP 273/17	nd	Heces	M	67	Bredeney
LSP 197/09	HUC	Heces	M	0	Infantis
LSP 223/09	HUC	Heces	H	2	Infantis
LSP 161/10	HUC	Heces	M	35	Infantis
LSP 75/12	HUC	Heces	M	27	Infantis
LSP 76/12	HUC	Heces	H	27	Infantis
LSP 77/12	HUC	Heces	M	26	Infantis
LSP 78/12	HUC	Heces	M	29	Infantis
LSP 79/12	HUC	Heces	M	15	Infantis
LSP 80/12	HUC	Heces	M	17	Infantis
LSP 102/12	HJ	Orina	nd	nd	Infantis
LSP 37/13	HUCA	Úlcera cutanea	nd	nd	Infantis
LSP 97/13	HUCA	Heces	H	27	Infantis
LSP 148/13	HUC	Heces	H	81	Infantis
LSP 218/14	HUSA	Heces	M	50	Infantis
LSP 74/16	HUCA	Heces	H	12	Infantis
LSP 130/16	HUC	Heces	M	62	Infantis
LSP 180/16	HVN	Heces	H	78	Infantis
LSP 215/16	HUCA	Heces	M	3	Infantis
LSP 219/16	HUCA	Heces	H	72	Infantis
LSP 498/16	HUCA	Heces	M	86	Infantis
LSP 126/17	HVN	Heces	M	64	Infantis
LSP 148/17	HUCA	Heces	M	84	Infantis
LSP 216/17	HA	Heces	H	68	Infantis
LSP 236/17	HA	Heces	H	27	Infantis
LSP 306/17	HUSA	Exudado de herida	M	34	Infantis
LSP 45/18	HVN	Heces	M	84	Infantis
LSP 68/18	HCN	nd	M	75	Infantis
LSP 72/18	HUSA	Heces	H	53	Infantis
LSP 111/18	FHJ	Heces	H	95	Infantis
LSP 119/18	HUC	Heces	H	89	Infantis
LSP 120/18	HUC	Heces	H	88	Infantis
LSP 136/18	HA	Heces	H	60	Infantis
LSP 139/18	HUC	Heces	H	88	Infantis
LSP 145/18	HCN	Heces	H	67	Infantis
LSP 180/18	HUC	Heces	M	58	Infantis
LSP 209/18	HUC	Heces	H	6	Infantis
LSP 151/08	HUC	Heces	H	64	Paratyphi B
LSP 170/08	FHJ	Heces	M	61	Paratyphi B
LSP 185/08	HUC	Heces	H	4	Paratyphi B
LSP 204/08	HUC	Heces	H	3	Paratyphi B
LSP 210/08	HCN	Heces	H	4	Paratyphi B

(Continuación Anexo II)

LSP 227/08	HCN	Heces	M	3	Paratyphi B
LSP 242/08	HUC	Heces	H	3	Paratyphi B
LSP 246/08	HJ	Heces	H	3	Paratyphi B
LSP 273/08	HUC	Heces	M	3	Paratyphi B
LSP 306/08	HUC	Heces	M	3	Paratyphi B
LSP 108/09	CA	Heces	H	9	Paratyphi B
LSP 155/09	HUCA	Heces	H	6	Paratyphi B
LSP 165/09	HUCA	Heces	H	5	Paratyphi B
LSP 173/09	FHJ	Heces	M	73	Paratyphi B
LSP 180/10	HUC	Heces	M	0,5	Paratyphi B
LSP 211/10	HUCA	Heces	M	10	Paratyphi B
LSP 236/10	HUCA	Heces	M	5	Paratyphi B
LSP 248/10	HUCA	Heces	H	5	Paratyphi B
LSP 250/10	HUCA	Heces	H	10	Paratyphi B
LSP 142/11	HUCA	Heces	M	2	Paratyphi B
LSP 163/11	HUCA	Heces	H	2	Paratyphi B
LSP 200/11	HUC	Heces	M	6	Paratyphi B
LSP 14/12	HUSA	Heces	H	88	Paratyphi B
LSP 147/12	HUC	Heces	M	2	Paratyphi B
LSP 151/12	HUC	Heces	H	8	Paratyphi B
LSP 223/12	HUCA	Heces	H	6	Paratyphi B
LSP 241/12	HUSA	Sangre	M	30	Paratyphi B
LSP 249/12	HUCA	Heces	M	4	Paratyphi B
LSP 270/12	HUCA	Heces	M	2	Paratyphi B
LSP 322/14	HUSA	Heces	H	12	Paratyphi B
LSP 411/14	HUSA	Sangre	M	60	Paratyphi B
LSP 245/15	HUC	Heces	M	1	Paratyphi B
LSP 264/15	HUCA	Heces	H	5	Paratyphi B
LSP 410/15	HUC	Heces	M	1	Paratyphi B
LSP 176/17	HUCA	Heces	H	34	Paratyphi B
LSP 178/17	HUCA	Heces	H	1	Paratyphi B
LSP 184/17	HUSA	Heces	M	59	Paratyphi B
LSP 206/17	HUSA	Heces	M	87	Paratyphi B
LSP 209/17	HUSA	Heces	M	24	Paratyphi B
LSP 210/17	HUSA	Heces	M	24	Paratyphi B
LSP 228/17	HUSA	Heces	H	18	Paratyphi B
LSP 232/17	HUSA	Heces	M	3	Paratyphi B
LSP 262/17	HUSA	Heces	M	53	Paratyphi B
LSP 265/17	HUSA	Heces	H	57	Paratyphi B
LSP 81/08	HUCA	Heces	H	0,5	Kedougou

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública; HUCA; Hospital Universitario Central de Asturias.

b, CA, Clínica Asturias; HMN, Hospital Monte Naranco; HUCA, Hospital Universitario Central de Asturias; HUC; Hospital Universitario de Cabueñes; HCN, Hospital Cangas de Narcea; HVN, Hospital Valle del Nalón; ISN, Instituto Nacional de Silicosis; HJ, Hospital de Jario; HA, Hospital de Arriondas. FHJ, Hospital Fundación Jove; HUSA, Hospital Universitario San Agustín. HMN, Hospital Monte Naranco.

c, Sexo: H, hombre; M, mujer; nd, no determinado.

d, DT, “Definite Type”; RNDC, “Reaction but Did Not Conform”; UT, “UnTypeable”, ND, no determinado.

e, ND, no determinado.

Anexo IV. Aislamientos monofásicos procedentes de alimentos detectados durante el periodo 2008-2018 en el Principado de Asturias y analizados en este trabajo.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Muestra ^c	Fafotipo ^d	Serotipo ^e
LSP 79/11	L.S.P.P.A.	nd	UT	4,5,12:i-
LSP 88/11	L.S.P.P.A.	nd	U311	4,5,12:i-
LSP 189/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	DT138	4,12:i-
LSP 190/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	DT138	4,12:i-
LSP 191/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	U311	4,5,12:i-
LSP 192/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	U311	4,5,12:i-
LSP 193/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	U311	4,5,12:i-
LSP 194/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	U311	4,5,12:i-
LSP 195/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	U311	4,5,12:i-
LSP 196/12	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	DT138	4,12:i-
LSP 215/12	L.S.P.P.A.	Superficie canal bovino	RDNC	4,12:i-
LSP 76/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT193	4,5,12:i-
LSP 85/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT195	4,12:i-
LSP 87/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,5,12:i-
LSP 88/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,5,12:i-
LSP 89/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,5,12:i-
LSP 90/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,5,12:i-
LSP 91/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT195	4,5,12:i-
LSP 92/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,12:i-
LSP 95/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	UT	4,5,12:i-
LSP 164/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT195	4,12:i-
LSP 178/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT22	4,12:i-
LSP 182/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT193	4,12:i-
LSP 184/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT193	4,12:i-
LSP 185/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 186/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 187/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 188/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 189/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 190/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 191/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 192/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 193/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 194/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	UT	4,5,12:i-
LSP 195/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	U302	4,5,12:i-

(Continuación Anexo IV)

LSP 196/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT195	4,12:i:-
LSP 197/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT195	4,12:i:-
LSP 198/13	L.S.P.P.A.	Productos cárnicos	DT195	4,12:i:-
LSP 254/13	L.S.P.P.A.	Carne cerdo congelada	U311	4,12:i:-
LSP 255/13	L.S.P.P.A.	Lomo cerdo	U311	4,12:i:-
LSP 256/13	L.S.P.P.A.	cabeza y vísceras congeladas	U311	4,12:i:-
LSP 257/13	L.S.P.P.A.	Cortezas de cerdo crudas	U311	4,12:i:-
LSP 61/14	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos	DT138	4,12:i:-
LSP 62/14	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos	DT138	4,12:i:-
LSP 114/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT193	4,5,12:i:-
LSP 138/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT193	4,12:i:-
LSP 154/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT138	4,5,12:i:-
LSP 165/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT138	4,12:i:-
LSP 291/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 292/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT193	4,12:i:-
LSP 293/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i:-
LSP 295/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	UT	4,5,12:i:-
LSP 388/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	RDNC	4,12:i:-
LSP 389/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i:-
LSP 390/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i:-
LSP 391/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i:-
LSP 394/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 405/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	U311	4,5,12:i:-
LSP 406/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	UT	4,5,12:i:-
LSP 407/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	U311	4,5,12:i:-
LSP 408/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	U311	4,5,12:i:-
LSP 419/14	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	U311	4,5,12:i:-
LSP 498/14	L.S.P.P.A.	nd	DT138	4,12:i:-
LSP 36/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal porcino	DT195	4,12:i:-
LSP 37/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal porcino	DT195	4,12:i:-
LSP 38/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal porcino	DT195	4,12:i:-
LSP 55/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	DT195	4,12:i:-
LSP 56/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	DT195	4,12:i:-
LSP 57/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	DT195	4,12:i:-
LSP 61/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 62/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 63/15	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos crudo-curado	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 126/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 127/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	RDNC	4,5,12:i:-
LSP 153/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT138	4,12:i:-
LSP 183/15	L.S.P.P.A.	Huevos frescos	RDNC	4,12:i:-
LSP 232/15	L.S.P.P.A.	Carne de cerdo picada	DT195	4,12:i:-
LSP 233/15	L.S.P.P.A.	Carne de cerdo picada	DT195	4,12:i:-

(Continuación Anexo IV)

LSP 234/15	L.S.P.P.A.	Carne de cerdo picada	DT195	4,12:i-
LSP 235/15	L.S.P.P.A.	Canal bovino	ND	4,12:i-
LSP 236/15	L.S.P.P.A.	Canal bovino	ND	4,12:i-
LSP 237/15	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i-
LSP 238/15	L.S.P.P.A.	Producto cárnico	DT104B	4,12:i-
LSP 295/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 296/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 297/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 298/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	RDNC	4,5,12:i-
LSP 299/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 313/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 314/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 315/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 316/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 317/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 319/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	U302	4,5,12:i-
LSP 320/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT22	4,5,12:i-
LSP 321/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT22	4,5,12:i-
LSP 322/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT22	4,5,12:i-
LSP 323/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT22	4,5,12:i-
LSP 348/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 349/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 350/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,5,12:i-
LSP 351/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,5,12:i-
LSP 352/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 353/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 354/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 355/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 356/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 357/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,5,12:i-
LSP 358/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,5,12:i-
LSP 359/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,12:i-
LSP 360/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	DT138	4,12:i-
LSP 361/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 362/15	L.S.P.P.A.	Picadillo de jabalí	RDNC	4,5,12:i-
LSP 84/16	L.S.P.P.A.	Salchicha fresca	UT	4,12:i-
LSP 85/16	L.S.P.P.A.	Salchicha fresca	UT	4,12:i-
LSP 86/16	L.S.P.P.A.	Salchicha fresca	UT	4,12:i-
LSP 87/16	L.S.P.P.A.	Salchicha fresca	UT	4,12:i-
LSP 88/16	L.S.P.P.A.	Picadillo de origen desconocido	DT195	4,12:i-
LSP 90/16	L.S.P.P.A.	Producto cárnico fresco	RDNC	4,5,12:i-
LSP 92/16	L.S.P.P.A.	Canal de origen desconocido	DT104B	4,12:i-
LSP 93/16	L.S.P.P.A.	Canal de origen desconocido	DT138	4,5,12:i-
LSP 197/16	L.S.P.P.A.	Superficie de canal de origen desconocido	DT195	4,12:i-

(Continuación Anexo IV)

LSP 67/17	L.S.P.P.A.	Picadillo de cerdo adobado	ND	4,5,12:i-
LSP 68/17	L.S.P.P.A.	Hamburguesa de ternera	ND	4,5,12:i-
LSP 69/17	L.S.P.P.A.	Carne picada con vacuno	ND	4,5,12:i-
LSP 38/19	L.S.P.P.A.	Longaniza fresca	ND	4,5,12:i-

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, L.S.P.P.A., Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias.

c, nd, dato no disponible.

d, DT, “Definite Type”; UT, “UnTypeable”; RNDC, “Reaction but Did Not Conform”; ND: no determinando.

nd, ND, no determinando

Anexo V. Aislamientos procedentes de alimentos pertenecientes a otros serotipos con resistencias emergentes detectados durante el periodo 2008-2018 en el Principado de Asturias y analizados en este trabajo.

Aislamiento ^a	Procedencia ^b	Origen ^c	Serotipo
LSP 206/11	L.S.P.P.A.	nd	Bredeney
LSP 77/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Bredeney
LSP 100/12	L.S.P.P.A.	Salsa alioli	Infantis
LSP 78/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Infantis
LSP 79/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Infantis
LSP 80/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Infantis
LSP 81/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Infantis
LSP 94/13	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Infantis
LSP 27/14	L.S.P.P.A.	nd	Infantis
LSP 13/08	L.S.P.P.A.	Derivados cárnicos	Paratyphi B
LSP 136/15	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Kedougou
LSP 160/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Typhimurium
LSP 162/14	L.S.P.P.A.	Superficie de canal	Typhimurium

a, LSP, Laboratorio de Salud Pública.

b, L.S.P.P.A., Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias.

c, nd, dato no disponible.

6.2. Oligonucleótidos empleados en reacciones de PCR

Anexo VI. Oligonucleótidos específicos de genes de resistencia a antibióticos.

Antibiótico/ gen	Iniciador (5'-3')	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
AMPICILINA				
<i>bla</i> _{TEM-1b}	TEM-F/R	5'-TTGGGTGCACGAGTGGGT-3' 3'-TAATTGTTGCCGGGAAGC-5'	503	Ariet and Phillippon, 1991
CLORANFENICOL				
<i>cmlA1</i>	<i>cmlA</i> -F/R	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3' 3'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-5'	559	Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>floR</i>	<i>FloR</i> - F/R	5'-TGTCATTTACGGCATACTCG-3' 3'-ATCAGGCATCCCATTCCCAT-5'	435	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>catA1</i>	<i>catA1</i> -F/R	5'-CCACCGTTGATATATCCC-3' 3'-CCTGCCACTCATCGCAGT-5'	376	Guerra <i>et al.</i> , 2001
ESTREPTOMICINA				
<i>strA</i>	<i>strA</i> -F/R	5'-AAAATCGCACCTGCTTCCC-3' 3'-CCAATCGCAGATAGAAGGC-5'	669	Madsen <i>et al.</i> , 200
<i>strB</i>	<i>strB</i> -F/R	5'-GGATCGTAGAACATATTGGC-3' 3'-ATCGTCAAGGGATTGAAACC-5'	507	Martínez <i>et al.</i> , 2005
<i>aadA1</i>	<i>aadA</i> -F/R	5'-GTGGATGGCGGCCTGAAGCC-3' 3'-ATTGCCAGTCGGCAGCG-5'	526	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
<i>aadA2</i>	<i>aadA2</i> -F/R	5'-TGTTGGTACTGTGGCCGTA-3' 3'-GATCTCGCCTTTCACAAAGC-5'	622	Randall <i>et al.</i> , 2004
SULFONAMIDAS				
<i>sul1</i>	<i>sul1</i> -F/R	5'-CTTCGATGAGAGCCGGCGGC-3' 3'-GCAAGGCGGAAACCCGCGCC-5'	436	Sandvang <i>et al.</i> , 1997
<i>sul2</i>	<i>sul2</i> -F/R	5'-TCAACATAACCTCGGACAGT-3' 3'-GATGAAGTCAGCTCCACCT-5'	707	Chu <i>et al.</i> , 2001
<i>sul3</i>	<i>sul3</i> -F/R	5'-GAGCAAGATTTTTGGAATCG-3' 3'-CTAACCTAGGGCTTTGGA-5'	700	Perreten and Boerlin, 2003
TETRACICLINA				
<i>tet(A)</i>	<i>tetA</i> -F/R	5'-GCTACATCCTGCTTGCCT-3' 3'-CATAGATCGCCGTGAAAGA-5'	210	Ng <i>et al.</i> , 1999
<i>tet(B)</i>	<i>tetB</i> -F/R	5'-TTGGTTAGGGGCAATTTTG-3' 3'-GTAATGGGCCAATAATACCG-5'	659	Ng <i>et al.</i> , 1999
AMINOGLICÓSIDOS (Gentamicina, Kanamicina, tobramicina)				
<i>acc(3')-II</i>	<i>acc(3')-II</i> -F/R	5'-ATTCGAAAACCTCGGAGTC-3' 3'-CGGAGTGGCTCCGAAGTG-5'	800	Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>aac(3')-IV</i>	<i>acc(3')-IV</i> -F/R	5'-GTTACACCGGACCTTGA-3' 3'-AACGGCATTGAGCGTCAG-5'	675	Guerra <i>et al.</i> , 2001
<i>aphAI-IAB</i>	<i>aphAI-IAB</i> -F/R	5'-AAACGTCTTGCTCGAGGC-3' 3'-CAAACCGTTATTCATTCGTGA-5'	500	Frana <i>et al.</i> , 2001
<i>aph(3')-Id</i>	<i>aph(3')-Id</i> -F/R	5'-ATGGGCGCCTATCACAATTGG-3' 3'-TCGCCTCCAGCTTTCGTAGA-5'	-	Frana <i>et al.</i> , 2001

(Continuación anexo V)

TRIMETOPRIM				
dfrA1	dfrA-F/R	5'-GTGAAACTATCACTAATGG-3' 3'-CCCTTTTGCCAGATTTGG-5'	473	Guerra <i>et al.</i> , 2000
dfrA12	dfrA12-F/R	5'-ACTCGGAATCAGTACGCA-3' 3'-GTGTACGGAATTACAGCT-5'	462	Guerra <i>et al.</i> , 2001
dfrA7	dfrA7-F/R	5'-ACATTTGACTCTATGGGTGTTCTTC-3' 3'-AAAACCTGTTCAAAAACCAAATTGAA-5'	280	Grape <i>et al.</i> , 2007
dfrA15	dfrA15-F/R	5'-GTGAAACTATCACTAATGG-3' 3'-CCCTTTTGCCAGATTTGG-5'	473	Guerra <i>et al.</i> , 2001
QUINOLONAS				
qnrA	qnrA-F/R	5'-GGGTATGGATATTATTGATAAA-3' 3'-ATTATCACGACGGCCTAATC-5'	580	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrB	qnrB-F/R	5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3' 3'-GGAAAGACCGAAAGTGCTAG-5'	264	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrS	qnrS-F/R	5'-TGAAACCTACAATCATACATATCG-3' 3'-CCCATAACAACAAATAGGACTGATT-5'	428	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
CEFOTAXIMA				
<i>bla</i> _{CMY-2}	CMY-2-F/R	GCTGAGAGCTCATGATGAAAAAATCG GGTACGGATCCTTATTGCAGC	1.146	Liet <i>et al.</i> , 2015
<i>bla</i> _{CTX-M} universal	CTX-M-F/R	ATGTGCAGYACCAGTAACR TGGGTRAARTARGTSACCAGA	593	Hijazi <i>et al.</i> , 2016

Anexo VII. Oligonucleótidos utilizados en la reconstrucción de la SGI-1K de Kentucky.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Referencia
<i>int</i> -SGI1-K	CTTGCGAAAAACACAGCCTC	Este trabajo
S004-R	ACAGAGATCATCTGCAGGTG	Este trabajo
<i>orfB</i> -F	CTGTGGGTTATCGTAGCTTC	Este trabajo
<i>orfB</i> -R	TCATTGGGAGTTAGACCACC	Este trabajo
<i>traG</i> -R	TATCCCTACCCAGATTTGCAGC	Este trabajo
<i>traH</i> -S013	TGAGTACAAACCGAACTCCC	Este trabajo
S020-R	TTGTCACATCGATGCGACCATG	Este trabajo
S025-F	TGCGTTAGTCTCGAGATGTG	Este trabajo
S025-R	ACTACCAGTCCAGTGATCTG	Este trabajo
S026-R	TTCTAGACGATGCTAGACCC	Este trabajo
<i>resG</i> -R	TTCTTCCCACTGGCCTTGTC	Este trabajo
<i>int11</i> _In4*-F	GTTACGACATTCGAACCGTGCAGG	Este trabajo
<i>int11</i> _In4*-R	GGTCTGGTCATACATGTGATGG	Este trabajo
<i>qacEΔ1</i> -F	CAAGCTTTTGCCCATGAAGC	García <i>et al.</i> , 2011
IS6100-R	ATCGTCCGTCCGTCCAATC	Este trabajo
<i>merC</i> -F	TTGGTTCAGTCATCGGCAATGG	Este trabajo
<i>tetA</i> -F	GCTACATCCTGCTTGCCCT	García <i>et al.</i> , 2011
<i>tnpA</i> _Tn1721-F2	ACTGGCTGCAAAGTGTGAA	Martínez <i>et al.</i> , 2007
<i>tnpA</i> _Tn1721-R2	TCCGTAAGGGCCGAAACTTC	Martínez <i>et al.</i> , 2007
<i>tnpA</i> _Tn1721-R4	GAAGTTTCGGCCCTTACGGATG	Este trabajo
<i>strA</i> -R	CCAATCGCAGATAGAAGGC	García <i>et al.</i> , 2011
<i>tnpR</i> _Tn3-F	TCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTAT	Este trabajo
<i>tnpR</i> _Tn3-R	GTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGA	Este trabajo
S044-R	TCTTCGAGCGTCCAATGAAC	Este trabajo
<i>yidY</i> -R	CGGCACAATACAGGTAATCCCA	Este trabajo

Anexo VIII. Oligonucleótidos utilizados en la tipificación PBRT.

	Cebadores	Región/gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº Acceso
Multiplex 1	HI1-Fw/Rw	<i>parA-parB</i>	ggagcgatggactctcagtac/ tgccgtttcacctcgtgagta	471	AF250878
	HI2-Fw/Rw	Iterones	ttctcctgagtcacctgttaacac/ ggctcactaccgtgtcatcct	644	BX664015
	I1-Fw/Rw	RNAI	cgaaagccggaaggcagaa/ tcgtcgttcgccaagtctgt	139	M20413
Multiplex 2	X-Fw/Rw	<i>Oriγ</i>	aaccttagaggctattaaattgctgat/ tgagagtcacttttatctcatgttttagc	376	Y00768
	L/M-Fw/Rw	<i>repA, B, C</i>	ggatgaaaadacatgcatctgaa/ ctgcaggggcattcttagg	785	U27345
	N-Fw/Rw	<i>Repa</i>	gttaacgagcttaccgaag/ gtttcaactctgccaagttc	559	NC_003292
Multiplex 3	FIA-Fw/Rw	Iterones	ccatgctggttctagagaagggt/ gtataccttactgcttccgacg	462	J01724
	FIB-Fw/Rw	<i>Repa</i>	ggagttctgacacacgattttctg/ ctcccgtcgttcagggaatt	702	M26308
	W-Fw/Rw	<i>Repa</i>	cctaagaa caa caa agccccg/ ggcgcgcgcatagaacctg	242	U12441
Multiplex 4	Y-Fw/Rw	<i>Repa</i>	aattcaacaacactgtgcagcctg/ gcgagaatggaagatacaaaactt	765	K02380
	P-Fw/Rw	Iterones	ctatggcctgcaaacgocccagaaa/ tcacgcgccaggcgcagcc	534	M20134
	FIC-Fw/Rw	<i>repA2</i>	gtgaactggcagatgaggaagg/ ttctcctcgtcgccaadtagat	262	AH003523
Multiplex 5	A/C-Fw/Rw	<i>Repa</i>	gagaa cca aaga caa a gac cctgga/ acgacaaa cctgaa ttg cctcctt	465	X73674
	T-Fw/Rw	<i>repA</i>	ttggcctgtttgtgcctaaacca/ cgttgat tta cacttag dttggac	750	K00053
	FIIs-Fw/Rw	<i>repA</i>	ctgtcgtaa gctgattggc/ ctctgccacaaacttcagc	270	AE006471
Simples	F _{repB} - Fw/Rw	RNAI/ <i>repA</i>	tgatcgtttaaggaaatttg/ gaagatcagtcacacacatcc	270	AY234375
	K/B-Fw/K-Rw	RNAI	gcggtccggaaagccagaaaac/ tctttcacgagccgcca	160	M93063
	K/B-Fw/ B/O-Rw	RNAI	gcggtccggaaagccagaaaac/ tctggttccgccaagtctga	159	M28718

Anexo IX. Oligonucleótidos para la tipificación PBRT de plásmidos IncR e IncU.

Cebadores	Región/gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón (pb)	Nº Acceso
R-Fw/Rw	<i>repB</i>	tcgcttattcctgctcagc/ gtgtgctgtggtaagcctca	251	DQ449578
U-Fw/Rw	<i>repA</i>	tacgacacaagccagaaagg/ tcatggtacatctgggccc	843	DQ401103

6.3. secuenciación de genomas

Anexo X. Parámetros de calidad de los ensamblajes realizados en este trabajo.

Aislamiento	kmer	Contigs	N50	Contig más largo (bp)	Total pb in contigs	Contig > 1 kb	Librería	Cobertura	GenBank N° acceso
Aislamiento monofásicos clon español (n=39)									
LSP 389/97	75	153	261311	600326	5050147	73	469 +/- 17		^a _b
LSP 272/98	71	163	222788	600312	5007057	74	467 +/- 19	41x	JAHTGW000000000
LSP 21/00	75	134	222800	600267	5000909	60	465 +/- 17	32x	JAHTGY000000000
LSP 37/00	89	123	293481	746199	5046701	66	512 +/- 132	30x	JAHTGZ000000000
LSP 40/00	91	111	225736	746224	50466787	66	500 +/- 133	27x	JAHTHA000000000
LSP 127/00	89	126	225732	746333	5044571	69	493 +/- 129	28x	JAHTGX000000000
LSP 148/00	89	104	225732	746309	5009823	57	490 +/- 131	30x	JAHTHB000000000
LSP 151/00	89	119	225732	746181	5030031	66	495 +/- 132	24x	JAHTHC000000000
LSP 247/00	91	128	225732	746065	5058416	68	496 +/- 130	25x	JAHTHD000000000
LSP 417/00	91	120	293448	746314	5064494	70	510 +/- 136	26x	JAHTHE000000000
LSP 41/01	91	121	225736	746314	5053648	69	507 +/- 134	31x	JAHTHF000000000
LSP 66/01	91	116	225736	746102	5058931	66	523 +/- 136	23x	JAHTHG000000000
LSP 73/01	93	110	225736	746267	5027708	60	489 +/- 127	32x	JAHTHH000000000
LSP 80/01	89	119	225740	746393	5049561	67	490 +/- 128	20x	JAHTHI000000000
LSP 84/01	91	120	225732	746252	5048827	63	477 +/- 128	24x	JAHTHJ000000000
LSP 411/01	91	91	225736	746305	5004997	53	473 +/- 125	25x	JAHTHK000000000
LSP 576/01	91	122	225736	746185	5040210	69	465 +/- 127	23x	JAHTHL000000000
LSP 578/01	89	120	225732	746181	5042057	67	457 +/- 125	30x	JAHTHM000000000
LSP 3/02	91	124	225736	745992	5042057	71	478 +/- 135	25x	JAHTHN000000000

(Continuación Anexo X)

LSP 262/02	91	113	225736	766101	5045253	68	467+/-131	29x	JAHTHO0000000000
LSP 503/02	91	106	225736	746084	5022648	62	514+/-132	30x	JAHTHP0000000000
LSP 718/02	89	112	222489	600325	5045110	58	510+/- 132	27x	JAHTHQ0000000000
LSP 1142/03	93	139	293478	746304	5131838	76	523+/-139	31x	JAHTHR0000000000
LSP 207/08	131	144	223629	600357	5069991	61	469 +/- 59	24x	JAHTHS0000000000
LSP 196/10	93	88	362876	746223	4985176	52	518+/-142	40x	JAHHTT0000000000
LSP 481/12	131	101	362946	746782	4985454	50	428 +/- 130	48x	JAHTHU0000000000
LSP 62/12	131	96	363024	746776	4984459	50	411 +/- 128	47x	JAHTHV0000000000
LSP 127/12	131	110	223364	630318	5049893	51	308 +/- 101	76x	JAHTHW0000000000
LSP 61/13	131	127	223423	600379	5031963	57	341 +/- 91	59x	JAHTHX0000000000
LSP 87/13	93	108	225740	599849	5026179	56	512+/-140	33x	JAHTHY0000000000
LSP 195/13	93	118	225740	746168	5055787	59	521 +/-139	35x	JAHTHZ0000000000
LSP 245/13	131	116	223390	523102	4987608	56	324 +/- 103	70x	JAHTIA0000000000
LSP 259/13	131	113	225816	600373	4987131	50	326 +/- 97	71x	JAHTIB0000000000
LSP 474/14	131	123	223412	547024	5040436	60	382 +/- 116	59x	JAHTIC0000000000
LSP 2/15	131	182	223391	600379	5156906	79	273 +/-89	48x	JAHTID0000000000
LSP 438/15	131	118	225816	746536	5022939	54	411 +/- 126	46x	JAHTIE0000000000
LSP 304/17	131	126	223404	547082	5029841	61	338 +/- 106	72x	JAHTIF0000000000
LSP 54/18	131	174	222117	600379	5118629	78	388 +/- 125	57x	JAHTIG0000000000
LSP 148/18	131	120	222112	521454	5046163	60	404 +/- 125	58x	JAHTIH0000000000

(Continuación Anexo X)

Aislamientos monofásicos clon sud- europeo (n=7)												
LSP 255/08	93	93	320178	929652	4949921	48	531 +/- 142	26x	JAJCUN0000000000			
LSP 6/12	131	112	260872	930160	4963579	53	483 +/- 67	24x	JAJCUM0000000000			
LSP 40/12	89	120	324386	929430	4963851	49	523 +/- 129	27x	JAJCUL0000000000			
LSP 40/13	131	188	324728	478577	5061947	78	301 +/-94	78x	JAJCUK0000000000			
LSP 52/13	131	189	324746	929941	4973925	56	395 +/- 113	73x	JAJCUJ0000000000			
LSP 197/14	131	198	324887	930230	4963683	51	318 +/- 101	78x	JAJCUJ0000000000			
LSP 64/15	131	103	260762	929941	4920808	45	327 +/- 103	76x	JAJCUH0000000000			
Aislamientos monofásicos clon europeo (n=1)												
LSP 45/05	75	141	319444	799486	4915202	47	456 +/-18	32x	NAZH0000000000			
Aislamientos monofásicos clon europeo CTX-R (n=20)												
HUD 1/12	117	131	319261	1014100	5323913	52	528+/-145	50x	JAICCN0000000000			
HUD 2/12	117	123	415385	929792	5309364	44	546+/-147	26x	JAICCM0000000000			
HUD 3/12	117	104	341666	1012649	5122035	36	539+/-148	48x	JAICCL0000000000			
HUD 2/14	115	96	341611	929895	5130018	32	561+/-152	23x	JAICCK0000000000			
HUD 3/15	119	98	415425	838161	5288026	34	561+/-149	32x	JAICCJ0000000000			
HUD 1/16	117	126	319361	650392	5256219	46	539+/-145	44x	JAICCI0000000000			
HUD 2/16	89	112	341443	650087	5222712	39	569+/-152	54x	JAICCH0000000000			
HUD 3/16	93	108	316415	502569	5027274	48	580+/-149	20x	JAICCG0000000000			
LSP 50/12	131	140	258066	628606	5313106	58	337 +/- 116	19x	JAICCC0000000000			
LSP 126/12	123	144	276730	821276	5288421	59	363 +/- 116	78x	JAICCY0000000000			

(Continuación Anexo X)

LSP 132/12	131	207	257985	737283	5304243	59	350 +/- 114	38x	JAICCX0000000000
LSP 236/14	131	118	316150	813530	5013638	36	488 +/- 67	22x	JAICCW0000000000
LSP 149/15	131	109	282880	635557	5067811	40	389 +/- 125	32x	JAICCV0000000000
LSP 248/17	131	140	316089	970260	5324767	56	406 +/- 125	20x	JAICCU0000000000
LSP 323/17	131	97	316153	929723	5131777	38	485 +/- 57	35x	JAICTT0000000000
LSP 14/08	131	137	240117	626054	5361595	61	409 +/- 127	46x	JAICCS0000000000
LSP 83/18	131	169	232902	527576	5363855	77	399 +/- 127	24x	JAICCR0000000000
LSP 98/18	131	150	283097	737075	5354607	63	409 +/- 125	48x	JAICCO0000000000
LSP 112/18	131	147	260989	970326	5394276	63	389 +/- 123	73x	JAICCP0000000000
LSP 210/18	131	154	283097	737457	5356655	64	481 +/- 58	35x	JAICCO0000000000
Aislamientos monofásicos con europeo causantes de un caso de neumonía (n=4)									
HUCA_02174600	131	126	179255	497662	5050077	57	374 +/- 114	24x	JAHMHY0000000000
HUCA_020475219	131	132	210253	801237	5052367	55	375 +/- 112	33x	JAHMHX0000000000
HUCA_020475222	131	124	168359	737342	5051448	55	390 +/- 113	29x	JAHMHZ0000000000
HUCA_248014172	131	138	210243	737026	5054127	53	394 +/- 118	36x	JAHMIA0000000000
Aislamientos monofásicos con europeo COL-R (n=4)									
LSP 237/15	117	100	341839	844,879	5087789	44	546 +/- 151	20x	JACXKV0000000000
LSP 295/15	117	79	44545	1,505,741	4937004	23	554 +/- 143	30x	JACXKU0000000000
LSP 298/15	117	86	440656	1,354,276	5026262	30	582 +/- 155	25x	JACXKT0000000000
LSP 38/19	131	218	316491	737,096	5416570	88	385 +/- 121	45x	JAGMWH0000000000

(Continuación Anexo X)

Aislamientos serotipo Kentucky (n=13)												
HUD 1/09	93	773645	2005087	4826400	18	573+/-155	19x	JACYBO0000000000				
HUD 2/12	117	415385	929792	5309364	44	546+/-147	20x	JACYBP0000000000				
LSP 2/13/09	131	749857	1981242	4911213	23	396 +/- 125	52x	JACYBW0000000000				
LSP 150/10	131	773753	2003827	4843533	21	321 +/- 106	38x	JACYBX0000000000				
HUD 1/13	93	817987	2004730	4860101	17	562+/-149	19x	JACYBQ0000000000				
HUD 1/14	115	773778	2004641	4802065	19	568+/-158	30x	JACYBR0000000000				
LSP 105/15	131	818266	2004693	4858615	16	363 +/- 115	50x	JACYBY0000000000				
HUD 1/15	93	773572	2004640	4827143	19	574+/-155	19x	JACYBS0000000000				
HUD 1/17	93	773617	2035951	4850418	15	586+/-154	20x	JACYBT0000000000				
LSP 235/17	131	818144	2004440	4859250	17	383 +/- 122	87x	JACYBZ0000000000				
LSP 314/17	131	773796	2000029	4798087	14	341 +/- 120	53x	JACYCA0000000000				
HUA 3/18	89	773590	1210202	4825331	22	495 +/- 122	23x	JACYBU0000000000				
HUA 10/18	89	773479	2003592	4868868	24	374 +/- 145	21x	JACYBV0000000000				
Aislamientos serotipo Typhimurium (n=4)												
HUD 3/14	117	521611	803710	4994093	31	563+/-150	23x	JAICDI0000000000				
LSP 160/14	123	316081	929899	5011422	55	473 +/-64	26x	JAICDQ0000000000				
LSP 162/14	127	316089	930042	4998837	52	466 +/-60	26x	JAICDP0000000000				
HUD 2/15	113	316454	778422	5279324	51	554+/-150	25x	JAICDH0000000000				

(Continuación Anexo X)

Aislamientos serotipo Infantis (n=2)									
HUMV 1/13	93	88	245837	1195887	4998779	44	516 +/- 130	22x	JAICDN0000000000
HUMV 1/15	91	86	245896	1195313	5000585	44	525 +/- 130	26x	JAICDM0000000000
Aislamientos serotipo Corvallis (n=2)									
HUA 5/18	85	78	795230	2081448	4887704	22	508 +/- 126	25x	JAHCQJ0000000000
HUA 6/18	87	131	407429	1548594	4886051	46	506 +/- 129	41x	JAHCQJ0000000000
Aislamientos serotipo Bredeney (n=2)									
HUD 4/12	93	91	651678	1937452	4960091	44	541 +/- 148	22x	JAICDS0000000000
HUMV 1/18	91	73	544651	1359036	4790437	31	506 +/- 126	22x	JAICDR0000000000
Aislamientos serotipo Enteritidis (n=1)									
HUD 3/09	117	55	489980	1548967	4818202	27	573 +/- 155	20x	JAICDO0000000000
Aislamientos serotipo Paratyphi B (n=1)									
HUMV 1/16	85	71	397973	723443	4803216	30	511 +/- 127	26x	JAICDJ0000000000
Aislamientos serotipo Kedougou (n=1)									
LSP 136/15	93	72	758678	2046871	4835744	20	512 +/- 135	25x	JAICDL0000000000

(Continuación Anexo XI)

LSP_578_01	54	53	69	51	78	27	51	75	61	50	90	71	50	73	45	51	54	93	49	43	50	49	46	46	89	91	73	63	93	93	56	0	71	72	52	23	50	49	40	70
LSP_61_13	67	66	74	60	81	74	60	34	64	69	45	30	61	32	64	66	69	69	48	66	48	67	56	59	37	44	46	32	74	50	69	71	0	31	67	78	63	64	41	31
LSP_62_12	70	63	77	65	84	77	63	15	67	68	46	11	62	13	67	59	68	49	69	51	66	61	60	60	45	47	1	77	51	70	72	31	0	72	81	70	67	42	38	
LSP_66_01	44	43	57	39	74	57	49	75	57	42	86	71	36	73	47	45	44	89	41	31	42	45	38	44	85	87	73	53	91	58	52	67	72	0	61	40	49	44	66	
LSP_718_02	61	62	76	56	85	38	60	84	68	61	97	80	57	82	56	60	63	100	58	50	61	58	55	55	96	98	82	70	102	67	23	78	81	61	0	55	60	53	75	
LSP_73_10	40	39	35	35	72	55	47	71	55	42	84	69	38	71	43	41	44	87	37	29	42	43	34	42	83	85	71	51	89	52	50	65	70	40	55	0	45	40	58	
LSP_80_01	49	50	64	46	71	54	40	68	54	49	83	66	45	68	30	52	51	86	50	38	49	40	43	13	82	84	68	58	88	35	49	64	67	49	60	45	0	37	61	
LSP_84_01	44	43	59	43	66	45	41	45	49	42	60	41	38	43	33	43	44	63	41	33	38	37	36	34	59	61	43	53	65	42	40	41	42	44	53	40	37	0	40	
LSP_87_13	66	67	81	61	88	73	61	39	71	66	52	37	64	39	61	69	70	55	65	55	66	57	60	58	51	53	39	75	57	70	31	38	66	75	58	61	40	0		

Anexo XII. Informacion de los plásmidos IncC (67) e IncA (1) utilizados para el análisis filogenético de pUO-STmRV1.

Plasmid	Size (bp)	Organism	Source	Country	Year of isolation	GenBank accession no.
Type 1 IncC (n=34)						
pIP40a	167,554	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Human	France	1969	KX709966
pDGO100	217,306	<i>Escherichia coli</i>	Human	Australia	1981	KU897026
pRMH760	170,613	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Human	Australia	1997	KF976462
pR148	165,906	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Fish	Thailand	2007	JX141473
pNDM102337	165,974	<i>E. coli</i>	Human	Canada	2008	JF714412
pNDM-1_Dok01	195,560	<i>E. coli</i>	Human	Japan	2009	AP012208
pNDM-KN	162,746	<i>K. pneumoniae</i>	Human	Kenya	2009	JN157804
pNDM10505	166,744	<i>E. coli</i>	Human	Canada	2010	JF503991
pNDM10469	137,813	<i>K. pneumoniae</i>	Human	Canada	2010	JN861072
pKP1-NDM-1	137,552	<i>K. pneumoniae</i>	Human	Australia	2010	KF992018
pNDM-US	140,825	<i>K. pneumoniae</i>	Human	USA	2010	CP006661
pKAZ4	166,991	Uncultured bacterium	Lake sediment	India	2012	KR827393
pNDM-116-17	167,382	<i>Vibrio cholerae</i>	Seepage water	India	unk	LN831185
pNDM15-1078	176,048	<i>E. coli</i>	Human	Canada	unk	CP012902
R16a	170,404	<i>E. coli</i>	Human	France	1966	KX156773
pAPEC199061	161,081	<i>E. coli</i>	Turkey	USA	1995	HQ023863
pAM04528	158,213	<i>Salmonella enterica</i>	Human	USA	1998	FJ621587
pSN254	176,473	<i>S. enterica</i>	unk	USA	2000	CP000604
pSH111_166	165,791	<i>S. enterica</i>	Cow	USA	2001	JN983043
pAR060302	166,530	<i>E. coli</i>	Cow	USA	2002	FJ621588
pCFSAN007425_01	166,496	<i>S. enterica</i>	Turkey	USA	2002	CP009411
peH4H	148,105	<i>E. coli</i>	Cow	USA	2002	FJ621586
pCFSAN000934_02	158,521	<i>S. enterica</i>	Dog	USA	2003	CP009567
pCVM22425	158,195	<i>S. enterica</i>	Cow	USA	2003	CP009560
pCFSAN000405_01	190,923	<i>S. enterica</i>	Turkey	USA	2004	CP009409
IncA/C-LS6	171,925	<i>S. enterica</i>	Turkey	USA	2004	JX442976
pCFSAN007428_01	164,924	<i>S. enterica</i>	Chicken	USA	2006	CP009414
pUMNK88	160,573	<i>E. coli</i>	Pig	USA	2007	HQ023862
pIMP-PH114	151,885	<i>K. pneumoniae</i>	Human	France	2010	KF250428
pCFSAN001921	221,009	<i>S. enterica</i>	Chicken	USA	2011	CP006050
pYDC637	199,469	<i>E. coli</i>	Human	USA	2013	KP056256
pSN254b	152,216	<i>A. salmonicida</i>	Fish	Canada	unk	KJ909290
pSD_174	173,673	<i>S. enterica</i>	Cow	USA	unk	JF267651
pRMT2581	64,562	<i>E. coli</i>	Lettuce	USA	2010	CP007137

(Continuación Anexo XII)

Type 2 IncC (N=17)									
pR55	170,810	<i>K. pneumoniae</i>	Human	France	1969	JQ101984			
pIP1202	182,913	<i>Yersinia pestis</i>	Human	Madagascar	1995	NC_009141			
pP99-018	150,157	<i>Photobacterium damselae</i>	Fish	Japan	1999	NC_008612			
pSRC119-A/C	174,068	<i>S. enterica</i>	Pig	Australia	2000	KM670336			
pEA1509_A	162,202	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Human	France	2001	FO203354			
pPG010208	135,803	<i>E. coli</i>	Cow	Chile	2004	NC_019065			
pVC1447	159,635	<i>V. cholerae</i>	Human	China	2005	KM083064			
p1643_10	167,779	<i>S. enterica</i>	Turkey	Poland	2010	KF056330			
pSCEC2	135,615	<i>E. coli</i>	Pig	China	2010	KF152885			
pKAZ1	149,696	Uncultured bacterium	Lake sediment	India	2012	KM506769			
pKAZ2	177,334	Uncultured bacterium	Lake sediment	India	2012	KR827391			
pKAZ3	147,957	Uncultured bacterium	Lake sediment	India	2012	KR827392			
pKEC-a3c	272,297	<i>Citrobacter freundii</i>	Environment	USA	2012	CP007558			
pKEC-dc3	268,334	<i>K. pneumoniae</i>	Human	USA	2012	CP007732			
pKOX-86d	193,725	<i>K. oxytoca</i>	Human	USA	2012	CP008790			
pTC2	180,184	<i>Providencia stuartii</i>	Human	Greece	2012	JQ824049			
pEd-G4873	153,958	<i>E. cloacae</i>	unk	unk	unk	KR559890			
Type 1/2 hybrid IncC (N=16)									
pYR1	158,038	<i>Y. ruckeri</i>	Fish	USA	unk	CP000602			
pPm14C18	165,992	<i>Proteus mirabilis</i>	Chicken	China	2014	KU605240			
pHM881QN	160,687	<i>K. pneumoniae</i>	Human	Japan	2008-11	LC055503			
pEc19	188,855	<i>E. coli</i>	Gull	Australia	2012	KY887591			
pEc78	233,057	<i>E. coli</i>	Gull	Australia	2012	KY887595			
pKp55	215,528	<i>K. pneumoniae</i>	Gull	Australia	2012	KY887594			
pCf53	200,459	<i>C. freundii</i>	Gull	Australia	2012	KY887593			
pCf52	219,342	<i>C. freundii</i>	Gull	Australia	2012	KY887592			
pEc9	228,517	<i>E. coli</i>	Gull	Australia	2012	KY887590			
pKAZ5	222,486	Uncultured bacterium	Sediment	India	2012	KR827394			
pASP-a58	198,307	<i>A. veronii</i>	Human	USA	2013	CP014775			
pECAZ155_KPC	272,202	<i>E. coli</i>	Human	China	2013	CP019001			
p11298-tetA	190,310	<i>C. freundii</i>	unk	China	<2017	KY986974			
pAR_0156_unitig_1	180,262	<i>P. mirabilis</i>	unk	unk	<2017	CP021853			
pBML2526	204,791	<i>Providencia rettgeri</i>	Human	Japan	2018	LC507075			
pUO-STrRV1	197,365	<i>S. enterica</i>	Human	Spain	1997	CP018220			
Outgroup (N=1)									
pRA1	143,963	<i>A. hydrophila</i>	Fish	Japan	1971	FJ705807			

Unk, unknown.



Universidad de Oviedo