

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

Identificación, tipificación y estudios de resistencia/virulencia de una cepa multiresistente de *Salmonella enterica* serotipo Choleraesuis: análisis fenotípico y genómico.



Candela García Prada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Biología

Febrero/2023



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



RESUMEN

Salmonella enterica es una de las principales causas de infecciones transmitidas por alimentos, lo cual tiene un enorme impacto social y económico. El objetivo de este trabajo consistió en la caracterización de una cepa de *S. enterica* serotipo Choleraesuis (LSP 148/13), aislada en el Hospital Universitario de Cabueñes. Este serotipo se encuentra adaptado a cerdos y puede transmitirse a humanos a través de la cadena alimentaria, causando preferentemente infecciones invasivas graves.

Para la caracterización de la cepa se utilizaron técnicas experimentales y análisis bioinformático de su genoma. Se determinó el fenotipo de resistencia identificando los genes responsables mediante amplificación por PCR. La cepa presentó resistencia frente a múltiples antibióticos, en concreto ampicilina (gen *bla*_{TEM-1B}), estreptomina (*aadA1* y *aadA2*), cloranfenicol (*cmIA1*), sulfonamidas (*sul1* y *sul3*), tetraciclina [*tet(B)*] y trimetoprim (*dfrA1*). Además, se utilizó la PCR para rastrear la presencia de regiones o genes específicos de integrones. Finalmente, el análisis plasmídico de la cepa reveló la presencia de un único plásmido, de 50 Kb aproximadamente.

El análisis bioinformático del genoma secuenciado confirmó que LSP 148/13 pertenecía a la especie *S. enterica*, al serotipo *S. Choleraesuis* y en particular a la secuencia tipo ST145, detectada también en otros países de Europa. Además, permitió localizar la mayoría de los genes de resistencia en dos integrones de clase 1, uno de tipo *sul1* (*aadA1*, *dfrA1* y *sul1*) y otro de tipo *sul3* (*aadA1*, *aadA2*, *cmIA1* y *sul3*). El análisis del genoma indicó que el plásmido identificado de forma experimental se correspondía con pSCV, el plásmido de virulencia específico de *S. Choleraesuis*, que lleva genes que codifican factores importantes para el desarrollo de la enfermedad. A pesar de que se han descrito derivados de este plásmido portadores de genes de resistencia, todos los encontrados en este trabajo se localizan en el cromosoma. La resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la medicina actual por lo que el seguimiento y caracterización de bacterias resistentes, como la analizada en el presente estudio, es importante para su control.

ABSTRACT

Salmonella enterica is one of the main causes of foodborne infections, which has enormous social and economic impact. The objective of this work was the characterization of a strain of *S. enterica* serotype Choleraesuis (LSP 148/13), isolated at the Hospital Universitario de Cabueñes (Gijón, Asturias). This serotype is highly adapted to pigs, can be transmitted to humans through the food chain and preferentially causes severe invasive infections.

For the characterization of the strain, experimental techniques and bioinformatic analysis of its genome were used. The resistance phenotype was determined and the genes responsible were identified by means of PCR amplification. The strain presented resistance against multiple antibiotics, specifically ampicillin (*bla*_{TEM-1B} gene), streptomycin (*aadA1* and *aadA2*), chloramphenicol (*cmlA1*), sulfonamides (*sul1* and *sul3*), tetracycline [*tet(B)*] and trimethoprim (*dfrA1*). PCR amplification was also used to screen for the presence of integron-specific regions or genes. Finally, plasmid analysis of the strain revealed the presence of a single plasmid, of approximately 50 kb.

The bioinformatic analysis of the sequenced genome confirmed that LSP 148/13 belonged to the species *S. enterica*, to the serotype *S. Choleraesuis* and in particular to the sequence type ST145, also detected in other European countries. In addition, it located most of the resistance genes into two class 1 integrons, one of the *sul1* type (*aadA1*, *dfrA1* and *sul1*) and another of the *sul3* type (*aadA1*, *aadA2*, *cmlA1* and *sul3*). Genome analysis indicated that the experimentally identified plasmid corresponded to pSCV, the virulence plasmid specific of *S. Choleraesuis*, which carries genes encoding virulence factors important for disease development. Despite the fact that derivatives of this plasmid carrying resistance genes have been described, all those found in the present work were located on the chromosome. Antibiotic resistance is one of the major problems facing medicine today, so the monitoring and characterization of resistant bacteria, such as the one analysed in this study, is important for its control.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

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

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Género Salmonella	1
1.2	Patogenicidad	1
1.2.1	Fiebre entérica	2
1.2.2	Enfermedad gastrointestinal.....	2
1.2.3	Factores de virulencia	4
1.3	Resistencia a los antibióticos	5
1.4	Serotipo <i>S. Chloreaesuis</i>	9
1.5	Objetivos	9
2	MATERIAL Y MÉTODOS	10
2.1	Cepas de <i>Salmonella enterica</i>	10
2.2	MEDIOS DE CULTIVO, aislamiento y conservación de los aislamientos	10
2.3	Análisis de la resistencia a antibióticos	11
2.4	Detección de genes de resistencia e integrones	12
2.5	Extracción de plásmidos	13
2.6	Secuenciación y ensamblaje del genoma	14
2.7	Análisis bioinformático	15
2.8	Reconstrucción de integrones y del plásmido de virulencia pSCV	16
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1	Determinación del fenotipo de resistencia	16
3.2	Detección de genes de resistencia e integrones	17
3.3	Identificación de plásmidos	19
3.4	Análisis bioinformático de la cepa LSP 148/13	20
3.4.1	Análisis de la calidad de las lecturas obtenidas en la secuenciación y su ensamblaje	20
3.4.2	Identificación de la especie bacteriana.....	21

3.4.3	Identificación de genes de resistencia.	23
3.4.4	Estructura genética del plásmido de virulencia.	25
4	Conclusiones	26
5	Bibliografía	27



1 Introducción

1.1 Género *Salmonella*.

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, e incluyen dos especies *S. bongori* y *S. entérica*. Esta última comprende 6 subespecies (subsp). diferentes entre las que se encuentra la subsp. *enterica*. Las bacterias del género *Salmonella* son importantes patógenos siendo capaces de infectar y causar enfermedad a aves y mamíferos incluidos el hombre (Holschbach and Peek, 2018).

Los miembros del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos, en su mayoría móviles gracias a flagelos peritricos. Son aerobios facultativos, con un metabolismo fermentativo y oxidativo, son catalasa positivos y oxidasa negativos y necesitan un pH entre 6,6 y 8,2 para que su crecimiento sea óptimo (Madigan *et al.*, 2015).

En la última revisión llevada a cabo por el Instituto Pasteur en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Referencia e Investigación de *Salmonella* se han descrito más de 2.600 serotipos. La diferencia entre ellos se establece siguiendo el sistema de clasificación de Kauffmann-White-Le Minor, basado en la composición antigénica de los antígenos somáticos O, flagelares H y, en algunos casos, el capsular Vi (Grimont and Weill, 2007). Los antígenos somáticos son polisacáridos que forman parte del lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Los antígenos flagelares se deben a la flagelina que es la proteína estructural de los flagelos. Cada célula bacteriana posee 2 genes homólogos de flagelina que codifican para antígenos flagelares H1 y H2, tradicionalmente llamados antígeno de fase 1 y de fase 2, respectivamente. Estos pueden expresarse en la célula bacteriana de forma alternativa mediante un mecanismo llamado “cambio de fase”. En el caso de que la bacteria exprese los dos tipos flagelares se denomina bifásica, y en el caso de que exprese sólo un tipo flagelar se denomina monofásica. Finalmente, algunos serotipos que tienen cápsula presentan el antígeno capsular Vi (Echeita *et al.*, 2005; Rodicio *et al.*, 2011).

1.2 Patogenicidad.

Dentro del género *Salmonella*, las bacterias de la subsp. *enterica* son las principales responsables de provocar infecciones en humanos. El tipo de enfermedad que generan va a depender del serotipo,



y estos se pueden clasificar desde el punto de vista clínico en dos grupos: tifoideos y no tifoideos. Los serotipos tifoideos causan fiebre entérica, mientras que los serotipos no tifoideos, entre los que se encuentra *S. Choleraeuis*, objeto del presente trabajo, causan enfermedad gastrointestinal. (Leiva *et al.*, 2018).

1.2.1 Fiebre entérica.

Causada por los *serotipos S. Typhi* y *S. Parathyphi*. Se trata de una infección sistémica grave frecuente en países del continente asiático y africano donde las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes debido principalmente a la falta de agua potable y de sistemas de saneamiento de aguas residuales. Se estima que cada año contraen esta enfermedad entre 11 y 20 millones de personas de las que mueren entre 123.000 y 161.000 según la OMS. Estas bacterias, una vez transmitidas por vía fecal-oral, llegan a colonizar el íleon y el ciego superando entre otras barreras, la acidez gástrica del estómago y la microbiota intestinal. Una vez allí, penetran en las células M que recubren las placas de Peyer y estas las ceden a las células dendríticas a través de las cuales pueden dispersarse por la circulación sanguínea e instalarse en diversos órganos como el bazo, el hígado o la médula ósea, donde se multiplican. Desde ahí pueden regresar a la sangre y, desde la vesícula biliar, pueden re-infectar el intestino, provocando necrosis de las placas de Peyer e incluso peritonitis (Coburn *et al.*, 2007; Jurado Jiménez *et al.*, 2010).

Una vez iniciada la infección, esta presenta un periodo de incubación de entre 5 y 12 días, a partir de los cuales se muestran los síntomas que pueden ir desde un cuadro leve hasta manifestaciones neuropsiquiátricas o bradicardia. Sin tratamiento antibiótico la fiebre tifoidea presenta una mortalidad del 10-15%, mientras que si se suministra el tratamiento antibiótico adecuado esta se reduce al 1-2% (Sanhuesa Palma *et al.*, 2016).

1.2.2 Enfermedad gastrointestinal.

Al igual que la fiebre tifoidea, la enfermedad gastrointestinal, causada por los serotipos no tifoideos, tiene una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, aunque su importancia es también considerable en el primer mundo; su transmisión es por vía fecal-oral. Los primeros síntomas aparecen de 6 a 48 horas después de la ingesta de bebida o alimento contaminado por *Salmonella*. Estos comienzan con diarrea y pueden ir acompañados con fiebre en las primeras 48-72 horas, calambres y dolor abdominal. Los síntomas suelen desaparecer espontáneamente a los 5-7 días en ausencia de tratamiento el cual sólo está indicado en aquellos casos en los que se muestren signos



de bacteriemia, que son entre un 1-4%, y afectan mayoritariamente a ancianos con patologías previas y personas infectadas con VIH. El porcentaje de muerte es casi nulo, pero puede ocurrir, sobre todo en pacientes ancianos y en inmunodeprimidos (Jurado Jiménez *et al.*, 2010). Según la OMS, cada año enferman por infecciones debidas a serotipos no tifoideos una de cada 10 personas y mueren 33 siendo una de las 4 causas principales de diarrea.

Estas bacterias llegan a alcanzar el intestino, donde tienen la capacidad de invadir las células epiteliales gracias a la modificación del citoesqueleto de actina. Dentro del citoplasma, *Salmonella* se encuentra en una vacuola denominada SCV, siendo después liberada a la lámina propia mediante un proceso conocido como migración transepitelial. *Salmonella* también consigue atravesar el epitelio intestinal de forma pasiva, gracias a las células M y las células dendríticas (Figura 1). En la lámina propia, las bacterias son reconocidas por receptores presentes en los fagocitos y son internalizadas por estos. Sin embargo, *Salmonella* tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos, aumentando transitoriamente su número, hasta que la acción conjunta de los macrófagos activados por los linfocitos T colaboradores y los neutrófilos, consiguen controlar la infección. Por ello, la mayoría de las infecciones causadas por los serotipos no tifoideos quedan confinadas al intestino, aunque ocasionalmente las bacterias pueden diseminarse a través de la sangre y linfa, dando lugar a infecciones invasivas (Garai *et al.*, 2012; Fàbrega and Vila, 2013).

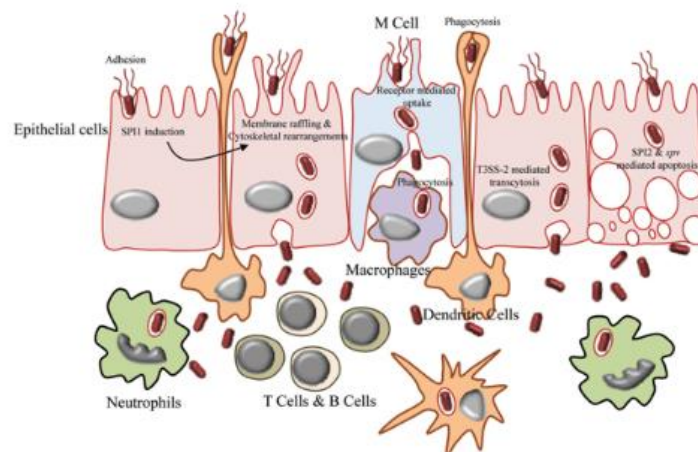


Figura 1. Modelo de patogénesis de los serotipos no tifoideos de *Salmonella enterica*. Los serotipos no tifoideos de *S. enterica* se adhieren al epitelio intestinal y, gracias a la modificación del citoesqueleto de actina, penetran en los enterocitos, para después alcanzar la lámina propia por transcitosis. Ahí las bacterias son internalizadas en macrófagos donde sobreviven y se multiplican, pudiendo, con baja frecuencia diseminarse a través de la sangre y la linfa. *Salmonella* también puede atravesar el intestino gracias a las células M o las células dendríticas (Fàbrega and Vila, 2013).



1.2.3 Factores de virulencia.

La capacidad de un patógeno de infectar un hospedador y sobrevivir dentro de él, necesita una serie de factores de virulencia. Se trata de un conjunto de elementos codificados por genes que se pueden encontrar en el cromosoma o en plásmidos (Maulén, 2011). Entre ellos destacan los codificados por las denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* o SPIs.

Las islas de patogenicidad son: amplias regiones cromosómicas con la particularidad de que albergan genes de virulencia. En el caso de *Salmonella* se han identificado más de 21 SPI, siendo SPI1 y SPI2 las más importantes. La primera resulta esencial para la invasión del epitelio intestinal y la segunda para la multiplicación en macrófagos (Marquez *et al.*, 2019).

Los **plásmidos** son moléculas extracromosómicas bicatenarias y circulares, capaces de replicarse de forma autónoma y que no contienen genes que codifican funciones esenciales para las bacterias. Desde 1971 existe un sistema de clasificación de plásmidos basado en grupos de incompatibilidad. La incompatibilidad es la incapacidad de dos plásmidos relacionados para mantenerse de forma estable en la misma línea celular; actualmente se reconocen 28 grupos de incompatibilidad en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. Estos se diferencian según su tamaño, mecanismo de transferencia y genes que portan, incluidos genes de virulencia y de resistencia (Carattoli, 2009; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

En *S. enterica* existen los denominados plásmidos de virulencia específicos de serotipo, de gran tamaño (50-100 kb), tales como pSLT de *S. Typhimurium* y pSCV de *S. Choleraesuis*. Todos ellos contienen un *locus* altamente conservado de 8 Kb, denominado *spv*, que aumenta la virulencia de la cepa que lo posee. Este locus contiene el gen *spvR* que codifica un regulador positivo y cuatro genes estructurales: *spvA*, cuyo producto está localizado en la membrana externa de la bacteria, *spvB* cuya función está relacionada con la etapa intracelular de la enfermedad, *spvC* tiene un papel importante durante el proceso proinflamatorio y *spvD* cuyo producto realiza funciones extracelulares. (Fierer and Guiney, 2001; Fàbrega and Vila, 2013).

Además, se han detectado una serie de plásmidos que albergan genes de resistencia a antimicrobianos y cuyo tamaño es superior al de los plásmidos de virulencia como pSLT o pSCV, de



los que derivan. Estos conservan la región *spv* pero no todos los genes presentes en el plásmido de virulencia y se denominan plásmidos híbridos (Mendoza *et al.*, 2009; Rodicio *et al.*, 2011).

Fimbrias: se trata de estructuras filamentosas que se extienden sobre la superficie de las bacterias y tienen diferentes funciones entre las que se encuentra la adhesión a receptores específicos del hospedador (Madigan *et al.*, 2015). *Salmonella* presenta varios tipos de fimbrias, entre las que se encuentran las fimbrias polares largas (Lpf), que median la unión de la bacteria a las palcas de Peyer (Fierer and Guiney, 2001).

1.3 Resistencia a los antibióticos.

Existen distintos tipos de antibióticos, con diferentes mecanismos de actuación. Entre ellos se encuentran los β -lactámicos, como la penicilina y la ampicilina, que bloquean la síntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular de las bacterias, provocando su lisis; los aminoglicósidos, al que pertenecen la estreptomycin y las tetraciclinas, que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas al interferir con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano; los fenicoles, como el cloranfenicol, que también interfiere con la síntesis de proteínas, pero en este caso actúan sobre la subunidad 50S impidiendo el paso de elongación; las sulfonamidas y el trimetoprim que pertenecen al grupo de inhibidores de la vía de síntesis del folato. Cada uno de ellos bloquea una etapa de esta ruta esencial para el crecimiento de las bacterias (Abushaheen *et al.*, 2020).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos se refiere a su capacidad de impedir o disminuir la acción de dichos compuestos. Puede ser intrínseca de las bacterias, cuando por ejemplo carecen del sitio de actuación (Munita and Arias, 2016), o adquirida a través de mutaciones en el cromosoma bacteriano o a través de la transmisión horizontal de material genético, siendo esta última la más importante desde el punto de vista médico (Rivera Calderón *et al.*, 2012; Peña *et al.*, 2014). Actualmente la resistencia constituye un grave problema a nivel mundial que ha ido aumentando año tras año (Munita and Arias, 2016; González Mendoza *et al.*, 2019). Esto se debe principalmente al uso indiscriminado o incorrecto de los antibióticos, tanto en la sanidad humana como en la ganadería.

La resistencia a los antibióticos ocurre a través de diversos mecanismos. Entre ellos se incluyen la modificación de la permeabilidad de la membrana para impedir su entrada, el bombeo del antibiótico hacia el exterior mediante bombas de expulsión, su alteración o destrucción enzimática,



así como la modificación de la diana de actuación o la síntesis de dianas alternativas que no serán afectadas por el antibiótico (Rivera Calderón *et al.*, 2012; Peña *et al.*, 2014). Por ejemplo, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos se debe principalmente a la producción de β -lactamasas, enzimas bacterianas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico, componente esencial de estos compuestos, inactivándolos. La resistencia a los aminoglicósidos se puede lograr mediante modificación química del antibiótico por enzimas sintetizadas por las bacterias, mientras que uno de los principales mecanismos de resistencia a cloranfenicol y a tetraciclina es la producción de bombas de expulsión. Finalmente, la resistencia a las sulfonamidas y trimetoprim se consigue gracias a la síntesis de enzimas de la vía del folato alternativos a los normales, que no son inhibidores por dichos compuestos (Abushaheen *et al.*, 2020).

Existen una serie de elementos genéticos muy relevantes en la dispersión de genes de resistencia. Entre ellos se encuentran los integrones, los elementos genéticos transponibles (secuencias de inserción y transposones) y los plásmidos (Munita and Arias, 2016).

Los **integrones** son sistemas de recombinación sitio específica, responsables del reconocimiento, captura y expresión de las denominadas casetes génicas, que frecuentemente codifican resistencia (Figura 2). Estas últimas son fragmentos de ADN cuyos componentes son, un marco de lectura abierto (ORF: Open Reading Frame) y un sitio *attC* de recombinación (Chaparro-Giraldo and Carreño-Venegas, 2016). La estructura básica de los integrones consta del gen *intI* que codifica una recombinasa sitio-específica o integrasa, localizándose a continuación el sitio de recombinación *attI*, donde se integran las casetes génicas. Entre estos dos componentes se encuentra el promotor *P_c*, que permite la expresión de la casete o casetes incorporadas, que no tienen promotor (González R *et al.*, 2004). Podemos clasificarlos en integrones de resistencia (IR), los cuales normalmente forman parte de transposones o plásmidos y contienen genes de resistencia a antibióticos y superintegrones (SI) que contienen un número elevado de casetes génicas que codifican diferentes funciones y se encuentran formando parte del cromosoma (Coque-González, 2005).

Dentro de los integrones de resistencia encontramos 5 clases, siendo los de clase 1 los más relevantes desde el punto de vista médico. En concreto, los integrones de clase 1 (Figura 2) constan de un extremo 5' muy conservado (5'CS) que contiene el gen de la integrasa (*intI1*) y el sitio de recombinación (*attI1*), mencionados anteriormente y un extremo 3' conservado (3'CS) donde se localizan los genes *qacE Δ 1* y *sul1*, que confieren resistencia a compuestos derivados de amonio



cuaternario que actúan como antisépticos y a sulfonamidas, respectivamente y una ORF de función desconocida. Entre los extremos 5'CS y 3'CS se encuentra una región variable donde se localizan las casetes génicas. Los integrones de clase 1 se consideran los principales responsables de la diseminación de casetes de resistencia en el genoma bacteriano (González *et al.*, 2004; Coque-González, 2005; Dessie *et al.*, 2013).

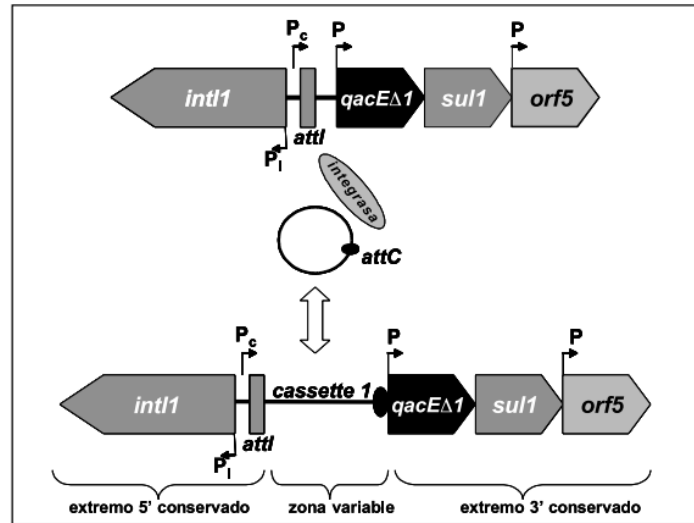


Figura 2. Estructura básica de un integrón e incorporación de una casete génica por recombinación específica de sitio (González R *et al.*, 2004).

También se han descrito integrones de clase 1 atípicos, conocidos como integrones *sul3*, por contener este gen en vez de *sul1*. Estos contienen el gen de *int1* en el segmento 5'-CS y los genes *qacH*, *sul3* y *orf1* en el extremo 3'-CS además de las secuencias de inserción IS440 y de IS26 (las secuencias de inserción se comentarán posteriormente). Se han encontrado 3 subtipos de integrones *sul3*, cada uno con una organización de las casetes diferente. Todos ellos portan genes *aadA* en la región variable y parece que el gen *sul3* pudo haber reemplazado al gen *sul1*, al igual que el gen *qacH* que parece haber reemplazado al gen *qacE* en la región 3'-CS (Antunes *et al.*, 2007).

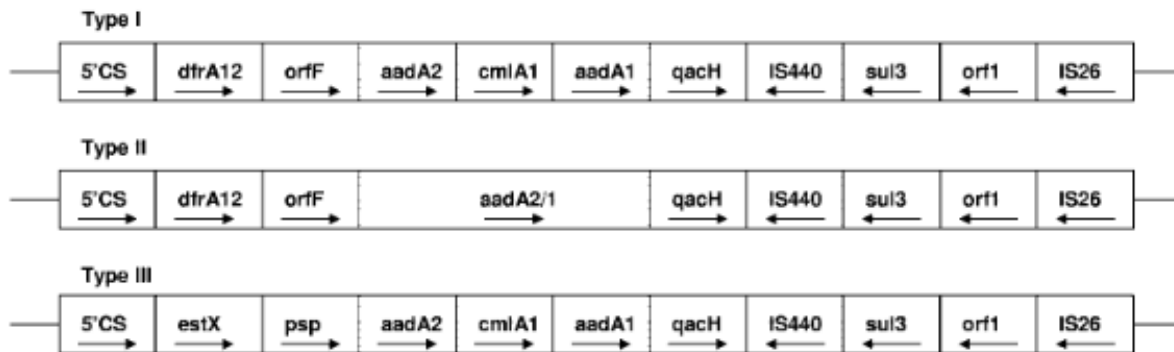


Figura 3. Organización de los 3 tipos de integrones asociados al gen *sul3* en *Salmonella* (Antunes et al., 2007).

Los **elementos genéticos transponibles**, como son las secuencias de inserción y los transposones, desempeñan también un importante papel en la dispersión de la resistencia. Las secuencias de inserción son los elementos genéticos transponibles más sencillos. Se trata de pequeños fragmentos de ADN que solo contienen el gen que codifica la transposasa, enzima implicado en su movilización, que se encuentra flaqueado por repeticiones terminales invertidas. Son capaces de insertarse de forma aleatoria en sitios distintos de una molécula de ADN y, algunas de ellas pueden movilizar genes adyacentes, incluidos genes de resistencia (Malachowa and DeLeo, 2010; Madigan *et al.*, 2015). Los transposones son fragmentos de ADN más complejos y, al igual que las secuencias de inserción, también son capaces de insertarse de forma aleatoria en sitios distintos de una molécula de ADN. Contienen el gen que codifica la transposasa pero incluyen además otros genes, entre ellos genes de resistencia a los antibióticos (Madigan *et al.*, 2015).

Los plásmidos, como ya hemos explicado, son elementos genéticos extracromosómicos, que no poseen genes esenciales para las bacterias en condiciones normales. Sin embargo, pueden aportar genes que confieren una ventaja adaptativa en determinadas circunstancias, como genes de resistencia a antibióticos, en presencia de estos compuestos (Madigan *et al.*, 2015). Un solo plásmido puede contener diversos genes de resistencia y puede proporcionar al huésped resistencia a hasta 6 familias de antibióticos, de manera que permite a la bacteria volverse multirresistente (Oromí Durich, 2000).



1.4 Serotipo *S. Choleraesuis*.

S. Choleraesuis, objeto del presente trabajo, pertenece a los serotipos no tifoideos. La gran mayoría de estos serotipos presentan amplio rango de hospedador, pudiendo infectar a una gran variedad de animales. Sin embargo, *S. Choleraesuis* se encuentra altamente adaptado a los cerdos, siendo estos su principal hospedador y reservorio. En estos animales causa una enfermedad sistémica grave, a menudo fatal, lo que conlleva grandes pérdidas económicas. Además, ocasionalmente puede transmitirse a humanos por consumo de carne de cerdo poco cocinada o por derivados de esta, contaminados con la bacteria. *S. Choleraesuis* también se diferencia de otros serotipos no tifoideos por ser altamente patógeno para seres humanos, causando generalmente una infección invasiva con limitada afectación del tracto intestinal (Chiu *et al.*, 2004). En cuanto a su epidemiología, cabe destacar que las infecciones por *S. Choleraesuis* han descendido considerablemente en países desarrollados. En la Unión Europea, en 2019, ocupó la posición 49 como causa de enfermedad humana debida a los serotipos no tifoideos. En concreto, se detectaron 31 casos, lo que supuso una frecuencia del 0,06%. Sin embargo, las infecciones por este serotipo son aún frecuentes en países asiáticos.

1.5 Objetivos.

Este Trabajo Fin de Grado se centró en una cepa de *S. entérica* serotipo *Choleraesuis* de origen clínico, detectado en el Hospital de Cabueñes (Gijón, Asturias). Para la caracterización de la cepa se abordan los siguientes objetivos:

1. Determinar el fenotipo de resistencia e identificar los genes responsables de las resistencias encontradas.
2. Determinar el contenido plasmídico.
3. Realizar un análisis bioinformático del genoma de la cepa, previamente secuenciado con Illumina, llevando a cabo *in silico* la identificación y tipificación de la cepa, así como la detección de plásmidos y genes de resistencia.
4. Determinar la estructura de las regiones de resistencia identificados en el genoma secuenciado y la del plásmido de virulencia.



2 MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Cepas de *Salmonella enterica*.

En este trabajo se utilizó la cepa LSP 148/13 de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serotipo Choleraesuis, aislada en el año 2013 a partir de heces en el Hospital Universitario de Cabueñes (Gijón, Asturias), y cedida por el Laboratorio de Salud Pública (LSP).

Como controles negativos o positivos en diferentes experimentos se utilizaron la cepa ATCC 14028 de colección y, las cepas LSP 146/02 y LSP 389/97, previamente caracterizadas en el Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo. Las dos primeras pertenecen al serotipo S. Typhimurium mientras que la tercera es una variante monofásica del mismo serotipo (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas *Salmonella enterica* subesp. *enterica* utilizadas como controles en los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de este trabajo.

Cepa ^a	Plásmidos	Perfil R ^b Fenotipo/genotipo	Referencia
ATCC 14028	pSLT-	Sensible/ -	Liu y Sanderson, 1992
LSP 389/97	pUO-STmRV1	AMP, CHL, [GEN, TOB], [STR, SPE], SUL, TET, TMP/ <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>cmiA1</i> , <i>acc(3)-IV</i> , <i>aadA2</i> , [<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i>], <i>tet(A)</i> , <i>dfrA12</i>	García <i>et al.</i> , 2011
LSP 146/02	pUO-StVR2	AMP, CHL, STR, SUL, TET/ <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>catA1</i> , <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(B)</i>	Herrero <i>et al.</i> , 2008

^a, ATCC: American Type Culture Collection; LSP: Laboratorio de Salud Pública.

^b, R: Resistencia; AMP: ampicilina; CHL: cloranfenicol; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; STR: estreptomina; SPE: espectomicina; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina; TMP: trimetoprima.

2.2 MEDIOS DE CULTIVO, aislamiento y conservación de los aislamientos

Los medios de cultivo empleados en la elaboración de este trabajo fueron los siguientes:

- Eosin Methylene Blue (EMB), medio sólido selectivo y diferencial para las bacterias de la familia de *Enterobacteriaceae*. Se preparó siguiendo las indicaciones de la marca comercial Oxoid.



- Mueller Hinton (MH), medio sólido comercial también preparado bajo las indicaciones de la marca comercial Oxoid. Es el medio utilizado rutinariamente para la realización de antibiogramas.
- Caldo Luria Bertani (LB), medio líquido preparado con 10 g de Triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura. Es un medio complejo adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias.

Todos los medios, fueron esterilizados en un autoclave a 121°C durante 20 minutos. Tanto la bacteria objeto de este trabajo como los controles utilizados en los diferentes experimentos, fueron aislados por agotamiento en medio EMB a partir de células congeladas en LB y glicerol, e incubados una noche a 37°C. Las colonias resultantes se utilizaron directamente en diferentes experimentos o fueron conservadas a 4°C. Finalmente, se llevó a cabo la conservación de las cepas a -20°C mediante el raspado del crecimiento bacteriano en LB y glicerol.

2.3 Análisis de la resistencia a antibióticos.

El antibiograma o técnica de difusión disco-placa es una prueba fenotípica que se utiliza para analizar la resistencia y/o susceptibilidad bacteriana a una serie de antibióticos utilizando discos de papel de filtro impregnados en una determinada cantidad de cada uno de ellos, colocados sobre un cultivo de la bacteria a analizar.

En este trabajo se partió de un cultivo puro obtenido sembrando un inóculo procedente de una colonia aislada en medio LB e incubándolo a 37°C durante una noche en agitación, a 260 rpm. A continuación, se sembraron 100 µl de una dilución 1/100 sobre la superficie de una placa de agar MH utilizando un hisopo hasta conseguir una distribución uniforme. Los discos que contenían los antibióticos a ensayar se distribuyeron en tres placas cuya disposición y cantidad en microgramos se recoge en la Tabla 2.



Tabla 2 Disposición de los discos de antibiótico y su cantidad en microgramos.

Placa 1	Placa 2	Placa 3
Tobramicina: TOB-10	Sulfonamidas: S3-300	Cefepima: FEP-30
Estreptomina: S-10	Nitrofurantoina: F-300	Ertapenem: ETP-10
Azitromicina: AZM-15	Trimetoprima: W-5	Cefoxitina: FOX-30
Tetraciclina: TE-30	Cloranfenicol: C-30	Ampicilina: AMP-10
Gentamicina: CN-10	Ácido nalidixico: NA-30	Amoxicilina / Ácido clavulánico: AMC-30
Amikacina: AK-30	Ciprofloxacino: CIP-5	Cefotaxima: CTX-30
Kanamicina: K-30		Colistina: CL-10

Los discos se colocaron sobre la superficie de las placas de medio MH previamente inoculadas y se incubaron durante una noche a 37°C, tras la cual se fotografiaron las placas y se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento formado alrededor de los discos en los casos que estuviese presentes. Como control negativo se incluyó la cepa ATCC 14028. Para la interpretación de los resultados se siguió la normativa establecida por el “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2020).

2.4 Detección de genes de resistencia e integrones.

Para detectar la presencia de genes de resistencia e integrones se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la preparación del ADN molde, se transfirió 1 ml de un cultivo de una noche, obtenido inoculando una colonia bacteriana en 2,5 ml de medio LB, a un tubo *ependorf*. Este, se centrifugó 6 minutos a 14.000 rpm y, una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en 300 µL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM/ EDTA 1 mM, pH 8). A continuación, se hirvió en un baño durante 10 minutos y se centrifugó durante 2 minutos a 14.000



rpm. Finalmente se recogió el sobrenadante, que contiene el material celular, congelándolo para evitar su degradación hasta su utilización.

Los componentes de la mezcla de reacción utilizados y su volumen fueron: cultivo hervido 1,5 μ L (ADN molde), NZYtaq II 2x Green Master Mix (Nzytech) 7,5 μ L (que incluye el tampón con $MgCl_2$, el enzima Taq polimerasa y los desoxirribonucleótidos (dNTPs)), 4 μ L H_2O destilada y 1 μ L de los oligonucleótidos cebadores directo y reverso. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se recogen en el anexo 1. La reacción se realizó en un termociclador que genera los ciclos de amplificación. Estos ciclos constan de 3 etapas: la **desnaturalización**, en la que se eleva la temperatura a 95°C para permitir que las dos hebras del ADN molde se separen, la segunda es el **anillamiento** en el que se produce la hibridación de los oligonucleótidos cebadores con las hebras del ADN a la temperatura seleccionada siguiendo la fórmula " $T^a = 2(A + T) + 4(C + G) - 4$ ", y la última etapa es la **elongación**, en la que se selecciona la temperatura óptima para permitir que la Taq polimerasa inserte los desoxinucleótidos a partir del cebador en las nuevas hebras que se están formando. En todos los experimentos de PCR se incluyeron controles positivos y negativos, en concreto, cepas que contienen o no el gen buscado.

Finalmente, las muestras se cargaron en geles de agarosa a una concentración del 1% en tampón TAE (Tris acetato 40 mM/ EDTA 1mM, pH 8). Los geles se sometieron a una electroforesis convencional durante 20 minutos a 120 V y seguidamente se tiñeron con bromuro de etidio (10 μ g/mL) para poder visualizar los resultados en un transiluminador con luz ultravioleta (UV).

2.5 Extracción de plásmidos.

La extracción de plásmidos se llevó a cabo por el método propuesto por **Kado and Liu** (1981), el cual permite la detección de plásmidos con tamaños comprendidos entre unas pocas Kb hasta unas 200 Kb aproximadamente. A partir de un cultivo de una noche en LB con agitación a 37 °C, se centrifugaron 1,5 ml del cultivo durante 5 minutos a 14000 rpm. El sedimento generado se resuspendió en 20 μ l de la solución KD-I (5 ml de Tris-HCl 1M pH8/ 200 μ l de EDTA 0,5M, pH 8) y se añadieron 100 μ l de la solución de lisis KD-II (75 μ l de NaOH 2N, 600 μ l de SDS al 10%, 10 μ l de Tris-HCl 1M pH 8), dejándolo incubar 30 minutos a 55°C con lo cual se consigue la lisis de las bacterias por acción del detergente y la desnaturalización del ADN y otros componentes celulares. A continuación, se añadieron 50 μ l de fenol ácido y 50 μ l de cloroformo/iso-aminoalcohol (48:2 v/v),



que permite la renaturalización del ADN plasmídico, separándolo del ADN cromosómico, proteínas y otros restos celulares. Finalmente, se centrifugó durante 20 minutos a 14000 rpm y se recogió la fase acuosa superior que contiene el ADN plasmídico congelándose para su posterior utilización.

Para analizar las muestras, se cargaron 20 μ l de la fase acuosa en un gel de agarosa al 0,6% en tampón TAE y se realizó la electroforesis y la visualización del ADN del modo indicado en el apartado 2.4. Como controles de tamaño se incluyeron los plásmidos extraídos de las cepas *Escherichia coli* 92 V517 (NCTC50192) que contiene plásmidos de 150 Kb, 65 Kb, 37 Kb y 7 Kb (Threlfall *et al.*, 1986); y *E. coli* 93 39R861 (NCTC50193) con plásmidos de 49,2 Kb, 8 Kb, 5,3 Kb y 4,6 Kb (Macrina *et al.*, 1978).

2.6 Secuenciación y ensamblaje del genoma.

El ADN genómico del aislamiento LSP 148/13 fue extraído con el kit comercial “GenElute Bacterial Genomic DNA Kit” (Sigma-Aldrich) por la Dra Xenia Vázquez Sánchez durante la realización de su tesis doctoral (Departamento de Biología Funcional, Área de Microbiología). La secuenciación fue realizada por la compañía Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania) mediante un secuenciador NovaSeq 600 S2 PE150 XP que utiliza una plataforma Illumina 1.9. A partir de genotecas con fragmentos de 500 pares de bases (pb) se obtienen lecturas pareadas de unos 150 nucleótidos. La empresa envió los archivos que contienen las secuencias limpias directas y reversas en formato fastq comprimidas (.gz), cuya calidad se evaluó con el programa ‘FastQC’ (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Este programa permite analizar la calidad de las lecturas (Phred o valor Q score en inglés, valor que representa la probabilidad de un error (P), es decir, la probabilidad de que una base sea incorrecta y se obtiene a través de la fórmula $Q = -10 \log_{10} (P)$, así como un control general para descartar que hubiese algún problema antes de realizar cualquier análisis posterior.

El ensamblaje del genoma se realizó con el ensamblador de novo ‘SPAdes versión 3.14.0’ (<https://cab.spbu.ru/software/spades/>). Este programa fragmenta las secuencias en k-meros de pequeño tamaño, para posteriormente realizar el solapamiento y ensamblaje de los mismos dando como resultado un archivo en formato fasta que contiene secuencias de mayor tamaño denominadas “contigs.” o “nodos”.



Una vez realizado el ensamblaje del genoma, se determinó su calidad con la herramienta “QUAST” en la versión 4.6.3 (<https://quast.sourceforge.net/download.html>), siendo de especial relevancia los parámetros como el N50 y el L50. Ordenando los contigs de mayor a menor tamaño el N50 es la longitud en pares de bases del contig en el que se alcanza el 50% del genoma y el L50 indica el número mínimo de contigs, que contienen el 50% del genoma. También proporciona los datos sobre el tamaño del genoma secuenciado y el contenido de bases CG.

2.7 Análisis bioinformático.

Una vez realizado el ensamblaje y analizada su calidad, se llevó a cabo el análisis bioinformático del genoma ensamblado empleando para ello una serie de herramientas disponibles online en el “Centro de Epidemiología Genómica (CGE) de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU)” (<http://www.genomicepidemiology.org/>), para las cuales se utilizan datos en formato Fasta.

Las herramientas empleadas en la elaboración de este trabajo fueron:

- ‘KmerFinder’, que permite la identificación de especies bacterianas, mediante comparación entre los k-meros (fragmentos de pequeño tamaño en los que se dividen las secuencias para su análisis) del genoma de estudio frente a los disponibles en la base de datos.
- ‘SeqSero’, esta herramienta determina el serotipo de *Salmonella* en base a los genes que codifican para los antígenos somáticos O y flagelares H.
- ‘MLST’, la cual permite establecer la secuencia tipo (ST) en base a la identificación de los alelos correspondientes a 7 genes conservados pertenecientes al genoma “core” de la bacteria (Achtman et al., 2012).
- ‘ResFinder’, esta herramienta permite tanto la identificación de mutaciones puntuales en genes de localización cromosómica, implicadas en resistencia, como la de genes de resistencia a antibióticos adquiridos por transmisión horizontal.
- ‘PlasmidFinder’, permite la detección de plásmidos mediante la comparación entre el genoma problema y los replicones contenidos en la base de datos.
- ‘pMLST’, para unos pocos grupos de incompatibilidad (IncF, Inc11, IncN, IncHI2 y IncHI1), esta herramienta tipifica los plásmidos en base a genes conservados.



2.8 Reconstrucción de integrones y del plásmido de virulencia pSCV.

Para la identificación y reconstrucción de los integrones y del plásmido de virulencia presentes en la cepa se empleó la herramienta 'Clone Manager' en la versión 7. Utilizando la secuencia de integrones de tipo *sul1* y *sul3* (CP04321.1 y EF051039.1) y el plásmido de referencia p28296/1 (CP051367), la herramienta identifica los contigs más similares a los de la cepa de interés mediante la función "scan for similarity". Una vez extraídos los contigs, éstos pueden ser ensamblados de uno en uno mediante el comando 'ligate' hasta su reconstrucción total. Para la representación gráfica se empleó "Easyfig" en la versión 2.5.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del fenotipo de resistencia.

El análisis de la cepa LSP 148/13 comenzó con su caracterización fenotípica analizando la resistencia y/o susceptibilidad frente a un panel de 21 antimicrobianos (ver materiales y métodos). Se demostró que la cepa de estudio es resistente a 6 antimicrobianos, y por tanto multirresistente (Figura 3). Cabe destacar que se considera un organismo multirresistente cuando presenta resistencia a tres o más familias de antimicrobianos. La cepa ATCC14028 empleada como control negativo fue sensible a todos los antibióticos ensayados.

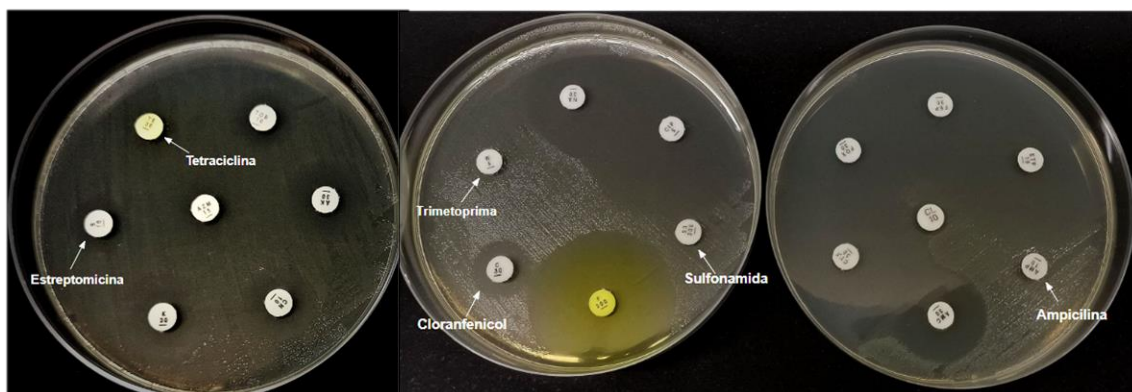


Figura 4. Antibiograma de la cepa LSP 148/13. Los resultados se interpretaron según las indicaciones dadas en *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI, 2019)*. Los antibióticos para los que se encontró resistencia se encuentran señalados con una flecha.



Como se observa en la figura 3, la cepa es resistente a la ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprima, estreptomina y cloranfenicol.

3.2 Detección de genes de resistencia e integrones.

Para conocer las bases genéticas de las resistencias encontradas se utilizó la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos específicos para diferentes genes (ver apartado 2.4 y anexo 1). Los resultados obtenidos muestran los amplicones esperados para los genes *aadA2*, *bla_{TEM-1B}*, *cmiA1*, *sul3*, *sul1*, *dfrA1* y *tet(B)*, tal y como se muestra en la figura 4 y tabla 3. Estos genes confieren resistencia a estreptomina, ampicilina, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas, respectivamente, concordando por tanto con el análisis fenotípico.

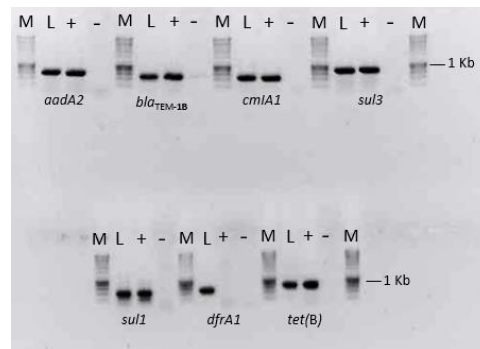


Figura 5. Identificación de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR. En la cepa LSP 148/13 se observan los amplicones correspondientes a todos los genes indicados. También para los controles positivos a excepción del correspondiente al 'dfrA1'. Los controles negativos no originaron ninguna señal. Calle "L": LSP 148/13; Calle "+": control positivo; Calle "-": control negativo; Calle "M": marcador de peso molecular.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en la bibliografía para *S. Choleraesuis* (Chu *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2004; Rodicio *et al.*, 2011) donde se describe el aumento continuado de la resistencia a estos antibióticos debido a la adquisición de genes de resistencia de localización cromosómica o plasmídica.



Tabla 3. Genes y resistencia que confieren.

Resistencia	Gen
Ampicilina	<i>bla</i> _{TEM-1B}
Tetraciclina	<i>tet</i> (B)
Sulfonamidas	<i>sul3, sul1</i>
Trimetoprima	<i>dfrA1</i>
Estreptomicina	<i>aadA2</i>
Cloranfenicol	<i>cmlA1</i>

En *Salmonella* entérica es frecuente que la mayoría de los genes de resistencia detectados forman parte de integrones. Por ello, se determinó mediante PCR la presencia/ausencia de estos elementos genéticos en la cepa LSP 148/13. Según se observa en la figura 5 se detectó el gen 'int1' de la integrasa, los marcos abiertos de lectura (Open Reading Frame) 'orf5' y 'orf1', el gen de 'tnpA' de la secuencia de inserción IS440', y los genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario 'qacE Δ1' y 'qacH', todos ellos característicos de los integrones *sul3* de clase1. (Guerra *et al.*, 2002).

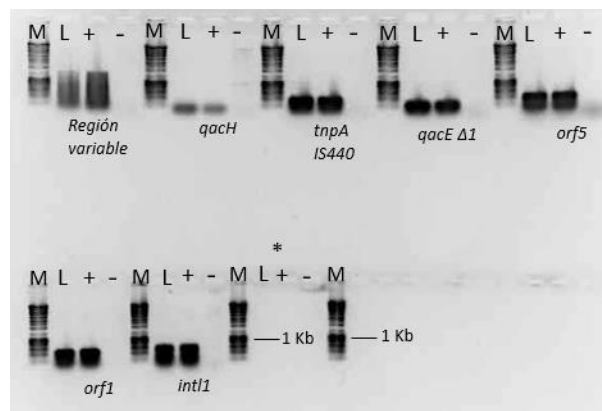


Figura 6. Identificación de genes típicos de integrones mediante amplificación por PCR. Calle "L": LSP 148/13; Calle "+": control positivo; Calle "-": control negativo; Calle "M": marcador de peso molecular. * Las reacciones fueron realizadas sin oligonucleótido.



3.3 Identificación de plásmidos.

Para averiguar si la cepa LSP 148/13 es portadora de algún plásmido se utilizó la técnica descrita por 'Kado and Liu (1981)' tal y como se explica en 'materiales y métodos'. En la calle 3, correspondiente a la cepa LSP 148/13, se observa una única banda situada entre la de 54Kb de *E. coli* 92 y la de 37Kb de *E. coli* 93 (ver figura 6). Por tanto, la cepa de estudio presenta un único plásmido de unas 50kb, que podría corresponder con el plásmido de virulencia pSCV específico de *S. Choleraesuis* (Chiu *et al.*, 2004). Sin embargo, varios estudios indican que a partir de pSCV se pueden generar diferentes plásmidos híbridos mediante la adquisición de genes de resistencia acompañado o no por deleciones en el plásmido de virulencia (Chu *et al.*, 2001; Guerra *et al.*, 2002). Esta posibilidad se analizará posteriormente.

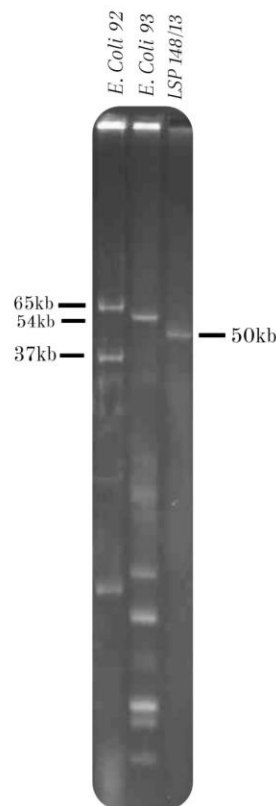


Figura 7. Perfil plasmídico de la cepa LSP 148/13 donde las dos primeras calles corresponden a los controles de tamaño (plásmidos procedentes de *E. coli* 92 y *E. coli* 93) y la tercera calle corresponde a la cepa en estudio donde se observa una única banda de aproximadamente 50 Kb.



3.4 Análisis bioinformático de la cepa LSP 148/13.

3.4.1 Análisis de la calidad de las lecturas obtenidas en la secuenciación y su ensamblaje.

La secuenciación del genoma de la cepa LSP 148/13 fue llevada a cabo por la casa comercial Eurofins que proporcionó dos archivos que contienen las lecturas limpias directas y reversas en formato fastq (ver material y métodos).

La calidad de estas lecturas se analizó con el programa 'FastQC el cual también permitió conocer el número de lecturas generadas durante la secuenciación (14647274). Los gráficos obtenidos al evaluar la calidad de las lecturas directas y reversas correspondientes al genoma de LSP 148/13 se muestran en la figura 5. Este gráfico representa la posición de cada base en la lectura en el eje X, mientras que en el eje Y se representa el nivel de calidad de cada base. En el caso de las lecturas directas se observaron valores Q superiores a 30 desde la primera a la última base de la lectura, lo cual indica que la probabilidad de que el secuenciador haya leído un base mal está comprendida entre 10^{-3} y 10^{-4} . Un resultado similar se obtuvo para las lecturas reversas, disminuyendo ligeramente al final en ambos casos.

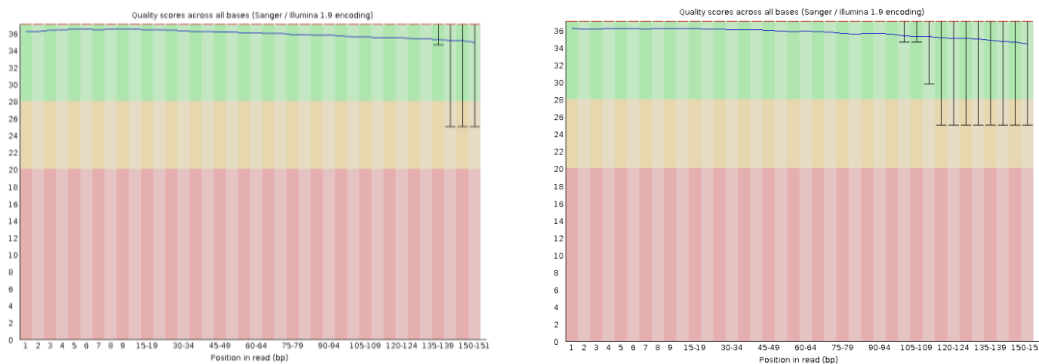


Gráfico 1. Análisis de la calidad de las lecturas directas (izquierda) e inversas (derecha) con el programa 'FastQC'. Se observa el valor Q para la mayoría de las bases dentro de la zona verde (Q superior a 30) de alta calidad.

Una vez analizada la calidad de las lecturas, el ensamblaje se realizó con el ensamblador "de novo" con SPAdes versión 3.14.0 obteniéndose un archivo en formato 'fasta' que contiene secuencias solapantes ensambladas de mayor tamaño denominadas 'contigs' o 'nodos'. La calidad del ensamblaje se evaluó con la herramienta QUASt versión 4.6.2, cuyos resultados se muestran en la



tabla 4. Se obtuvo un valor de L50 de 8, N50 de 210.233, valores relativamente buenos ya que la presencia de secuencias repetidas en el genoma (ADN que codifica para ARNs ribosomales y de transferencia, secuencias de inserción y transposones) impide ensamblar el genoma completo. La herramienta también suministró los datos del contenido GC (52,14%) y del tamaño completo del genoma analizado en contigs (4.758.331 nt) que están de acuerdo con los valores esperados para el genoma de *S. Choleraeuis*.

Tabla 4. Parámetros generados por la herramienta 'QUAST' para el genoma de la cepa LSP 148/13.

Parámetros	Cepa LSP 18/13
Número de contigs	90
L50	8
N50 (pb)	210.233
Contig más largo (pb)	558.771
Contig > 1Kb	61
Total pb en contigs	4.758.331
Contenido GC	52,14%

3.4.2 Identificación de la especie bacteriana.

De acuerdo con la información aportada por el LSP, esta cepa había sido identificada experimentalmente como *S. enterica* serotipo Choleraeuis. En este trabajo, esto se confirmó *in silico* mediante las herramientas bioinformáticas del CGE KmerFinder 3.2 y SeqSero 1.2 (ver apartado 2.6).

Kmer Finder es una herramienta basada en la fragmentación de las secuencias para generar lo que se denomina k-meros (de alrededor de 100pb), los cuales se comparan frente a una base de datos dando como resultado la mejor coincidencia. Por su parte, SeqSero se basa en la detección de genes que codifican antígenos de superficie característicos de los diferentes serotipos de *Salmonella*. En este caso, KmerFinder mostró una coincidencia del 97,88% entre el genoma LSP 148/13 y la especie *S. enterica* subsp. *enterica* serotipo Choleraeuis, mientras que SeqSero permitió su asignación al perfil antigénico 7:c:1,5, correspondiente al serotipo Choleraeuis. En este perfil, el 7 hace referencia al antígeno somático, mientras que c hace referencia al antígeno flagelar de primera fase



(H1) y el 1,5 a los antígenos flagelares de segunda fase (H2). El hecho de que existan antígenos H1 y H2 indica que la cepa es bifásica.

Además, se determinó la secuencia tipo o ST de la cepa en base a la combinación de los alelos correspondientes a 7 genes del genoma conservado de la bacteria mediante la herramienta MLST. El perfil alélico de LSP 148/13 se muestra en la Tabla 5 y corresponde a ST145.

Tabla 5. Secuencia tipo ofrecida por la herramienta 'MLST'.

Locus	Identidad	Cobertura	Alelo
<i>aroC</i>	100	100	<i>aroC_36</i>
<i>dnaN</i>	100	100	<i>dnaN_31</i>
<i>hemD</i>	100	100	<i>hemD_35</i>
<i>hisD</i>	100	100	<i>hisD_14</i>
<i>purE</i>	100	100	<i>purE_26</i>
<i>sucA</i>	100	100	<i>sucA_6</i>
<i>thrA</i>	100	100	<i>thrA_8</i>

Un estudio sobre la distribución del serotipo *S. Choleraesuis* en Alemania se encontró que el 97,9% de los aislamientos pertenecían a la ST145 y su principal reservorio era el jabalí. (Uelze *et al.*, 2021). Otro estudio sobre un brote epidémico de salmonelosis ocurrido en el año 2018-2019 en Austria y Eslovenia también demostró que todos los aislamientos analizados pertenecían a la ST145 y la posible transmisión de la bacteria causante del brote sería a través del consumo de alimentos derivados de animales como cerdos o jabalíes, llegando a infectar a humanos (Papić *et al.*, 2021). Esto sugiere que la ST145 es una secuencia abundante en Europa vinculada a un reservorio de cerdo y jabalí, pudiendo llegar a ocasionar brotes epidémicos como el ocurrido en Austria. El hecho de que la cepa analizada en este estudio presente también la ST145 apoya el hecho de que las cepas que están circulando en Europa procedan de un único clon. Sin embargo, para LSP 148/13 no se dispone de información sobre la posible fuente de transmisión de la enfermedad.



3.4.3 Identificación de genes de resistencia.

La identificación de genes de resistencia adquirida se llevó a cabo mediante la herramienta ResFinder 4.2, la cual también permite identificar la presencia de mutaciones puntuales en el cromosoma implicadas en resistencia. Esta herramienta identificó los genes *bla_{TEM-1B}*, *cmIA1*, *aadA2b*, [*sul3*, *sul1*], *tet(B)* y *dfrA1* (Tabla 6). Estos resultados concuerdan plenamente con el genotipo de resistencia obtenido experimentalmente (ver apartado 3.2). Por otra parte, el análisis de genes de integrones llevada a cabo experimentalmente sugirió la presencia de dos integrones de clase I, uno de tipo *sul1* y otro de tipo *sul3* (ver introducción). Esto se confirmó mediante el análisis del genoma de la cepa LSP 148/13 utilizando la herramienta ‘Scan for similarity’ de Clone Manager y las secuencias de integrones de tipo *sul1* (CP040321.1) y de subtipo III *sul3* (EF051039.1) como referencia. Los que contenían regiones de elevada similitud con las referencias fueron ensamblados según se muestra en la Figura 8.

Tabla 6. Análisis de los genes de resistencia de la cepa LSP 148/13 con la herramienta ‘ResFinder’ y los contigs en los que se encuentran.

Gen de resistencia	Identidad	Longitud	Contig	Número de acceso
<i>bla_{TEM-1B}</i>	100.0	861/861	NODE_38_length_7751_cov_69.612277	AY458016
<i>cmIA1</i>	99.9206349206	1260/1260	NODE_45_length_4375_cov_68.357815	M64556
<i>aadA2b</i>	99.8717948718	780/780	NODE_45_length_4375_cov_68.357815	D43625
<i>sul3</i>	100.0	792/792	NODE_46_length_3966_cov_129.044222	AJ459418
<i>sul1</i>	100.0	840/840	NODE_33_length_19862_cov_63.981708	U12338
<i>tet(B)</i>	100.0	1206/1206	NODE_33_length_19862_cov_63.981708	AF326777
<i>dfrA1</i>	99.7890295359	474/474	NODE_63_length_922_cov_58.540881	X00926

Comenzando con el integrón *sul1* se puede observar que los segmentos 5’-CS y 3’-CS son los característicos de este tipo de integrones y que en la región variable se encuentran las casetes de resistencia *dfrA1* y *aadA1*. Próximo al integrón se localizó el gen que confiere resistencia a tetraciclina *tet(B)*, en una región delimitada por dos secuencias de inserción *IS1* e *IS10* Para el integrón *sul3*, los segmentos 5’-CS y 3’-CS se ajustan a los descritos para el subtipo III y en la región variable se encuentran las casetes de resistencia *aadA2*, *cmIA1* y *aadA1*. La presencia de dos



integrones con la configuración identificada en la cepa LSP 148/13 ya había sido descrita en aislamientos de *S. Choleraesuis* (Antunes et al., 2007; Jiang et al., 2017). La única diferencia encontrada es la presencia de una secuencia de inserción *IS26* en el segmento 3'-CS del integrón *sul3* acompañada por la inversión del fragmento comprendido en las copias de *IS26* presentes en el segmento 3'-CS.

Finalmente, también se analizó el contig que contiene el gen *bla*_{TEM-1B}. Este gen está próximo a genes *mer* de resistencia a mercurio, seguidos de dos secuencias de inserción (*ISArsp14* e *IS26*).

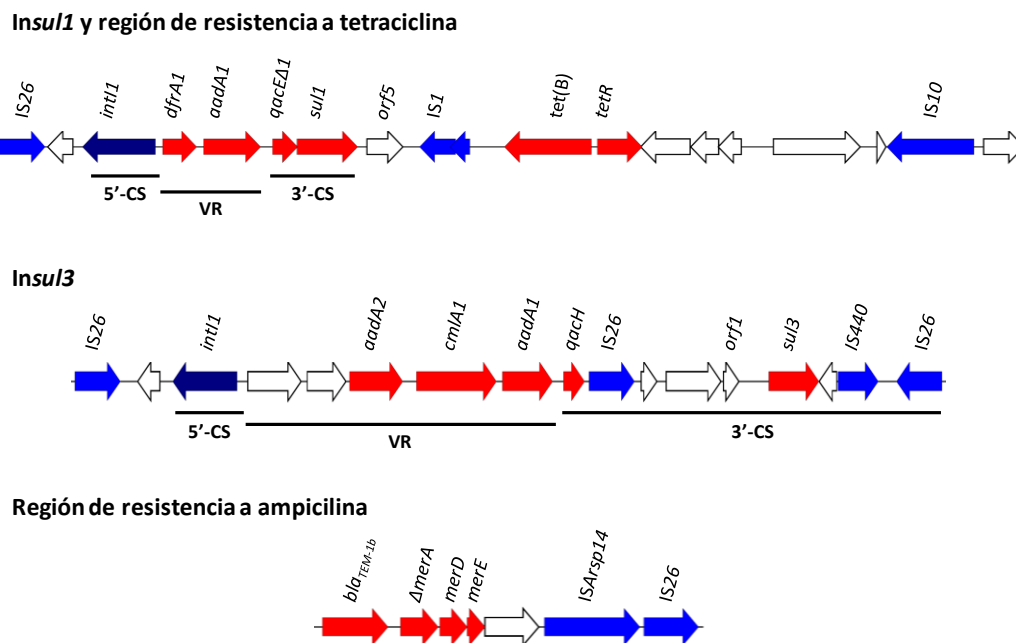


Figura 8. Estructura de las regiones de resistencia encontradas en el cromosoma de *S. enterica* serotipo *Choleraesuis* LSP 148/13, incluyendo los integrones de clase 1 de tipo *sul1* y de tipo *sul3*. En ambos integrones se señalan los segmentos 5'- y 3'-conservados (5'-CS y 3'-CS) y las regiones variables (VR) donde se localizan las casetes génicas. Los genes se representan por flechas que señalan la dirección de transcripción, utilizando el siguiente código de colores: rojo, genes de resistencia; azul oscuro, gene de la integrasa; azul claro, transposasas de secuencias de inserción; blanco, otros genes.

Para la identificación plasmídica se utilizó la herramienta 'Plasmid-Finder' 2.1, cuyos resultados se muestran en la Tabla 7. Esta herramienta identificó 2 replicones, ambos pertenecientes al grupo IncF, IncFIB(S) y el IncFII(S), con una identidad del 98.76% y 99.62%, respectivamente, con los presentes en su base de datos. Ambos se localizaron en el mismo "contig", de 49,666 Kb, lo que indica que pertenecen a la misma molécula de ADN. Cabe destacar que estos replicones son característicos de plásmidos de virulencia específicos de serotipo como pSLT y de *S. Typhimurium* y



pSCV de *S. Choleraesuis* (Rodicio et al., 2011). Nuevamente, los resultados obtenidos “*in silico*” concordaron con los obtenidos experimentalmente, identificándose en ambos casos la presencia de un único plásmido en el genoma de LSP 148/13.

Tabla 7. Análisis del genoma de la cepa LSP 148/13 con la herramienta ‘Plasmid-Finder’ donde se puede ver que existen dos replicones pertenece al grupo IncF y se encuentra en mismo contig.

Plásmidos	Identidad	Longitud	Contig	Número de acceso
IncFIB (S)	98.76	643/643	NODE_22_length_49666_cov_106.289792	FN432031
IncFII (S)	99.62	262/262	NODE_22_length_49666_cov_106.289792	CP000858

La tipificación pMLST 2.0 permite diferenciar a los plásmidos IncF en grupos homogéneos de acuerdo con la combinación de alelos correspondientes a genes conservados, los cuales codifican funciones relevantes para el plásmido. Los resultados pMLST del plásmido de la cepa LSP 148/13 se recogen en la tabla 8. De acuerdo a la combinación de alelos (FIB_19 y FII_2), este plásmido presenta la secuencia tipo [S2:A-B19].

Tabla 8. Análisis pMLST La presencia de los alelos FIB_19 y FII_2 tipo indica que el plásmido de la cepa LSP 138/14 pertenece a la secuencia tipo [S2:A-B19].

Locus	Identity	Coverage	Alignment Length	Allele Length	Gaps	Allele
FIA						No hit found
FIB	100.0	100.0	373	373	0	FIB_19
FIC						No hit found
FII						No hit found
FIIK						No hit found
FIIS	100.0	100.0	215	215	0	FII_2
FIIY						No hit found

3.4.4 Estructura genética del plásmido de virulencia.

El contig de aproximadamente 50 Kb, correspondiente al plásmido de la cepa LSP 148/13 (Figura 9) muestra una identidad superior al 99% con el pSCV de referencia (CP051367). Al igual que otros plásmidos de virulencia específicos de serotipo, porta el locus de virulencia *spv* que codifica para



proteínas citotóxicas y otros factores de virulencia, el operón *pef* que codifica fimbrias implicadas en la adherencia al epitelio intestinal de ratón, el gen *t1pA* cuyo producto actúa como termosensor y el gen *mig5* que codifica una anhidrasa carbónica cuya expresión se induce en el interior de los macrófagos. También lleva los genes implicados en su replicación y mantenimiento (replicones *IncFIB* e *IncFIIA*, *ccdAB* y *parAB*) y en su transferencia por conjugación (genes *tra*). A pesar de que se han descrito derivados de pSCV portadores de genes de resistencia, este no es el caso del descrito en el presente trabajo. De hecho, todos los genes de resistencia encontrados en la cepa LSP 143/14 se localizan en el cromosoma (Chu et al., 2001; Chiu et al., 2004).



Figura 9. Estructura del plásmido pSCV de *S. enterica* serotipo *Choleraesuis* LSP 148/13. Los genes se representan por flechas que señalan la dirección de transcripción, utilizando el siguiente código de colores: amarillo, genes de replicación y mantenimiento plasmídico; marrón, genes de conjugación; púrpura, genes de virulencia; blanco, otros genes.

4 Conclusiones

1. La cepa LSP 148/13 de *S. Choleraesuis* pertenece a la secuencia tipo ST145, al igual que otros aislamientos del mismo serotipo encontrados en Europa.
2. El análisis bioinformático del genoma de la cepa identificó los genes que codifican las resistencias a los antibióticos ampicilina, estreptomycin, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprim, detectadas experimentalmente mediante la técnica de difusión disco-placa o antibiograma.
3. Muchos de los genes de resistencia encontrados se localizaron en integrones de clase 1, de tipo *sul1* (*dfrA1*, *aadA1* y *sul1*) o de tipo *sul3* (*aadA1*, *aadA2*, *cmlA1* y *sul3*). Dichos integrones son responsables, en gran medida, del fenotipo multirresistente de la cepa estudiada.
4. El análisis “*in silico*” del único plásmido detectado experimentalmente en *S. Choleraesuis* LSP 148/13 demostró que se trata del plásmido de virulencia específico de este serotipo. A pesar de que se han detectado genes de resistencia en derivados híbridos de este plásmido, todos los encontrados en el presente trabajo fueron de localización cromosómica.



5 Bibliografía

Abushaheen, M.A., Muzaheed, Fatani, A.J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., et al. (2020) Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month* **66**: 100971.

Antunes, P., Machado, J., and Peixe, L. (2007) Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among Salmonella isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 1545–1548.

Carattoli, A. (2009) Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2227–2238.

Chaparro-Giraldo, A., and Carreño-Venegas, A. (2016) Diseño de casetes de expresión que confieran tolerancia a sequía y a glufosinato en maíz (*Zea mays*). *Acta biol Colomb* **21**: 555.

Chiu, C.-H., Su, L.-H., and Chu, C. (2004) *Salmonella enterica* Serotype *Choleraesuis*: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. *Clin Microbiol Rev* **17**: 311–322.

Chu, C., Chiu, C.-H., Wu, W.-Y., Chu, C.-H., Liu, T.-P., and Ou, J.T. (2001) Large Drug Resistance Virulence Plasmids of Clinical Isolates of *Salmonella enterica* Serovar *Choleraesuis*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2299–2303.

Coburn, B., Grassl, G.A., and Finlay, B.B. (2007) *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology & Cell Biology* **85**: 112–118.

Coque-González, M.T. (2005) Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**: 251–253.

Dessie, H.K., Bae, D.H., and Lee, Y.J. (2013) Characterization of integrons and their cassettes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from poultry in Korea. *Poult Sci* **92**: 3036–3043.



Echeita, M.A., Aladueña, A.M., Díez, R., Arroyo, M., Cerdán, F., Gutiérrez, R., et al. (2005) Distribución de los serotipos y fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-20. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **23**: 127–134.

Fàbrega, A., and Vila, J. (2013) *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clin Microbiol Rev* **26**: 308–341.

Fierer, J., and Guiney, D.G. (2001) Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *J Clin Invest* **107**: 775–780.

Garai, P., Gnanadhas, D.P., and Chakravortty, D. (2012) *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence* **3**: 377–388.

González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., and González Ponce, F. de M. (2019) La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana* **36**: 145–151.

González R, G., Mella M, S., Zemelman Z, R., Bello T, H., and Domínguez Y, M. (2004) Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Rev méd Chile* **132**.

Grimont, P., and Weill, F.-X. (2007) Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars, (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. *Institute Pasteur* 1–166.

Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., and Mendoza, M.C. (2002) Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2977–2981.

Holschbach, C.L., and Peek, S.F. (2018) *Salmonella* in Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **34**: 133–154.



Jiang, X., Xu, Y., Li, Y., Zhang, K., Liu, L., Wang, H., et al. (2017) Characterization and horizontal transfer of qacH-associated class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from retail meats. *Int J Food Microbiol* **258**: 12–17.

Jurado Jiménez, R., Arenas Muñoz, C., Doblas Delgado, A., Rivero, A., and Torre-Cisneros, J. (2010) Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* **10**: 3497–3501.

Leiva, J., Alonso, M.F., Rubio, M., and Ruiz-Bravo, A. (2018) Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* **12**: 2941–2951.

Macrina, F.L., Kopecko, D.J., Jones, K.R., Ayers, D.J., and McCowen, S.M. (1978) A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**: 417–420.

Madigan T, M., Martinko M, J., Bender S, K., Buckley H, D., and Stahl A, D. (2015) *Brock. Biología de los microorganismos*. 14th ed., Pearson, .

Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci* **67**: 3057–3071.

Marquez, M.C., Escorcía, G.B., and Larrea, J.D. (2019) Mecanismos de Patogenicidad de *Escherichia Coli* y *Salmonella SSP*. *Contactos, Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería* **5**–17.

Maulén, N.P. (2011) Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista médica de Chile* **139**: 1605–1610.

Mendoza, M. del C., Herrero, A., and Rodicio, M.R. (2009) Ingeniería evolutiva en *Salmonella*: la emergencia de plásmidos híbridos de virulencia-resistencia a antimicrobianos en serotipos no tifoideos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **27**: 37–43.

Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **4**: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015.



- Oromí Durich, J.** (2000) Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Med Integ* **36**: 367–370.
- Papić, B., Kušar, D., Mićunović, J., Vidrih, Š., Pirš, M., Ocepek, M., and Avberšek, J.** (2021) Genomic insights into *Salmonella Choleraesuis* var. *Kunzendorf* outbreak reveal possible interspecies transmission. *Veterinary Microbiology* **263**: 109282.
- Peña, Y.P., Hernández, M.E., and Castillo, V.L.** (2014) Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud* **6**: 30–38.
- Rivera Calderón, L.G., Motta Delgado, P.A., Cerón Urbano, M.F., and Chimonja Coy, F.A.** (2012) Resistencia de la Salmonela a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* **7**: 116–129.
- Rodicio, M.R., Herrero, A., Rodríguez, I., García, P., Montero, I., Beutlich, J., et al.** (2011) Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Reviews and Research in Medical Microbiology* **22**: 55.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., et al.** (2018) Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* **73**: 1121–1137.
- Sanhueza Palma, N.C., Farías Molina, S., Calzadilla Riveras, J., and Hermoso, A.** (2016) Typhoid fever: case report and literature review. *Medwave* **16**: e6474–e6474.
- Threlfall, E.J., Rowe, B., Ferguson, J.L., and Ward, L.R.** (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.
- Uelze, L., Bloch, A., Borowiak, M., Grobbel, M., Deneke, C., Fischer, M., et al.** (2021) What WGS Reveals about *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in Wildlife in Germany. *Microorganisms* **9**: 1911.

6 ANEXOS

6.1 Tabla de oligonucleóticos empleados en las reacciones de PCR.

Antibiótico/gen	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Referencia
Estreptomicina				
<i>aadA2</i>	<i>aadA2-F/R</i>	TGTTGGTTACTGTGGCCGTA/ GATCTCGCCTTTCACAAAGC	622	(Sandvang <i>et al.</i> , 1998)
Ampicilina				
<i>bla_{TEM-1B}</i>	<i>OT-1/2</i>	TTGGGTGCACGAGTGGGT/ TAATTGTTGCCGGAAGC	503	(Arlet and Philippon, 1991)
Cloranfenicol				
<i>cmlA1</i>	<i>cmlA-F/R</i>	GTCTAACGAGCTTACCGAAG/ GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	(Guerra <i>et al.</i> , 2001)
Sulfonamidas				
<i>sul1</i>	<i>sul1-F/R</i>	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC/ GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	436	(Sandvang <i>et al.</i> , 1998)
<i>Sul3</i>	<i>sul3-F/R</i>	GAGCAAGATTTTTGGAATCG/ CTAACCTAGGGTTTGGA	700	(Perreten and Boerlin, 2003)
Trimetoprima				
<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1-F/B</i>	GTGAAACTATCACTAATGG/ CCCTTTTGCCAGATTTGG	473	(Guerra <i>et al.</i> , 2000)
Tetraciclina				
<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)-F/R</i>	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG/ GTAATGGGCCAATAATACCG	659	(Ng <i>et al.</i> , 1999)