

Análisis genómico de dos aislamientos de origen alimentario de *Salmonella enterica* resistentes a colistina

Eliana Marcela Pereira Cardeno

Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Microbiología

Directora

Giovanna Rincón Cruz

Ph.D. Universidad de Buenos Aires

Codirector

Diego Mauricio Riaño Pachón

Dr. rer. nat Universidade de São Paulo

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2022

Dedicatoria

A Dios que me permitió estar aquí y vivir este gran logro con plenitud.

A mis padres por sus valiosas enseñanzas, por inculcarme la responsabilidad,
perseverancia y amor en cada etapa de este camino.

A mis hermanos por su apoyo incondicional y por recordarme cada día lo capaz que soy.

A la profesora Giovanna por trabajar junto a mi durante todo mi proceso de formación,
por su gran ayuda y comprensión cuando más lo necesite.

A mí misma por seguir luchando y creyendo que cumpliría este sueño.

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, la Escuela de Microbiología, el Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), y el Grupo de Supercomputación y Cálculo Científico de la UIS (SC3).

A mis tutores, la Profe Giovanna y Diego, por todas sus enseñanzas y su gran apoyo, fue un honor para mí hacer investigación a su lado.

A mis profesores de la Maestría en Microbiología, en cabeza de la Profesora Clara Sánchez, por ser parte fundamental de mi formación como Magister. También a mis compañeros de Maestría por su acompañamiento en este camino.

Al profesor Carlos Jaime, director del SC3, y a Luis Alejandro por toda su colaboración en el manejo de los recursos de supercomputación.

Finalmente, un agradecimiento infinito a mi familia y amigos, especialmente a Jesucito, por creer en mí y estar a mi lado en todo momento.

Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Planteamiento del problema y Justificación	16
2. Marco Conceptual y Estado del Arte	21
2.1 Género <i>Salmonella</i>	21
2.2 Resistencia en <i>Salmonella</i>	22
2.2.1 Resistencia a colistina en <i>Salmonella</i>	23
2.3 Caracterización de <i>Salmonella</i> por secuenciación de genoma completo	26
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. Metodología	31
4.1 Aislamientos	31
4.2 Extracción de ADN	31
4.3 Secuenciación	31
4.4 Análisis bioinformático	32
4.4.1 Control de calidad, ensamblaje y anotación	32
4.4.2 Tipificación molecular	33
4.4.2.1 Serovariedad.	33
4.4.2.1.1 Análisis comparativo de genomas.	34

4.4.2.1.2 Determinación directa.....	34
4.4.2.2 Secuenciotipo.....	34
4.4.3 Identificación determinantes de resistencia antimicrobiana	34
4.4.4 Caracterización plasmídica	36
4.4.4.1. Selección de <i>contigs</i> plasmídicos.....	38
4.4.4.2 Detección de plásmidos por PLSDB.....	39
4.4.4.3 Tipificación plasmídica.....	39
4.4.4.4 Búsqueda de plásmidos conjugativos.	40
5. Resultados.....	41
5.1 Selección de aislamientos de <i>Salmonella enterica</i>	41
5.2 Control de calidad.....	41
5.3 Ensamblaje.....	42
5.4 Tipificación molecular	51
5.5. Identificación de determinantes de resistencia antimicrobiana	52
5.5.1 Determinantes de resistencia a colistina de codificación cromosomal.....	61
5.6 Caracterización plasmídica	69
5.6.1 Búsqueda de plásmidos.....	76
5.6.2 Tipificación plasmídica.....	80
5.6.3 Búsqueda de plásmidos conjugativos	80
6. Discusión.....	81
7. Conclusiones	99
Referencias Bibliográficas	101
Apéndices.....	133

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Serovariedades de S. enterica con variantes mcr aisladas de carne de pollo</i>	25
Tabla 2. <i>Estadísticas de los datos brutos del genoma</i>	41
Tabla 3. <i>Genomas de Referencia usados en QUAST</i>	43
Tabla 4. <i>Estadísticas QUAST (sin referencia) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para los aislamientos de estudio</i>	44
Tabla 5. <i>Estadísticas QUAST (con referencias) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para el aislamiento 25TBS</i>	45
Tabla 6. <i>Estadísticas QUAST (con referencias) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para el aislamiento 33TXLD</i>	46
Tabla 7. <i>Reporte de Misassemblies en QUAST para los aislamientos de estudio</i>	50
Tabla 8. <i>Resultados serotipificación usando SeqSero2 y SISTR</i>	51
Tabla 9. <i>Determinantes de resistencia reportados por RGI para el genoma 25TBS</i>	52
Tabla 10. <i>Determinantes de resistencia reportados por ABRicate para el aislamiento 25TBS</i> ...	53
Tabla 11. <i>Genes de resistencia reportados por ResFinder para el aislamiento 33TXLD</i>	55
Tabla 12. <i>Determinantes de resistencia reportados por RGI para el aislamiento 33TXLD</i>	56
Tabla 13. <i>Determinantes de resistencia reportados por ABRicate para el aislamiento 33TXLD</i>	58
Tabla 14. <i>Gen y correspondiente proteína anotada asociadas con la resistencia a colistina para los dos aislamientos de estudio</i>	60
Tabla 15. <i>Sustituciones identificadas en la proteína PmrC en las dos cepas de estudio</i>	65

Tabla 16. Comparación de los dominios de la proteína transferasa de fosfoetanolamina en los aislamientos de estudio y los aislamientos de referencia	68
Tabla 17. Porcentaje de identidad entre las proteínas encontradas en InterProScan y las proteínas de interés	69
Tabla 18. Plásmidos de referencia usados para el alineamiento con el contig 12	71
Tabla 19. ANI del megaplásmido p33TXLD	74
Tabla 20. Contigs clasificados como plasmídicos por plasmidVerify y viralVerify en el genoma del aislamiento 33TXLD	77
Tabla 21. Correspondencia o regiones de correspondencia entre los contigs plasmídicos de Unicycler y SPAdes	77
Tabla 22. Plásmidos que alinearon con contigs diferentes a los que forman el megaplásmido ..	79

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Genes modificadores del LPS implicados en la resistencia a la polimixina en bacterias Gram negativas.</i>	25
Figura 2. <i>Grafos del genoma ensamblado del aislamiento 25TBS</i>	48
Figura 3. <i>Grafos del Genoma Ensamblado del Aislamiento 33TXLD</i>	48
Figura 4. <i>Alineamientos de las proteínas PmrA y PmrB de los aislamientos de estudio</i>	62
Figura 5. <i>Alineamientos de las proteínas PhoP y PhoQ de los aislamientos de estudio</i>	63
Figura 6. <i>Alineamiento de la proteína PmrD de los aislamientos de estudio</i>	64
Figura 7. <i>Alineamiento de la proteína PmrC de los aislamientos de estudio</i>	65
Figura 8. <i>Clasificación de la proteína MCR-1.1 en InterProScan</i>	67
Figura 9. <i>Alineamiento del contig 12 usando Mashmap y Nucmer</i>	70
Figura 10. <i>Alineamiento entre el plásmido pN55391 y el contig 12 usando Nucmer</i>	72
Figura 11. <i>Alineamiento del megaplásmido pN55391 y los contigs del genoma de 33TXLD</i>	73
Figura 12. <i>Anotación con Prokka y comparación con BLAST para megaplásmido p33TXLD</i>	75

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. <i>Calidad de secuencia por base en FastQC</i>	133
Apéndice B. <i>Contenido de GC por secuencia y niveles de duplicación por secuencia en FastQC</i>	134
Apéndice C. <i>Gráficas del alineamiento del contig 2 usando Mashmap y Nucmer</i>	135
Apéndice D. <i>Gráficas del alineamiento del contig 12 con dos plásmidos de referencia</i>	136
Apéndice E. <i>Alineamiento entre los genomas pESI de referencia y el genoma completo de 33TXLD</i>	137
Apéndice F. <i>Proteínas de referencia usadas en la comparación de arquitectura de dominios y para los alineamientos con las proteínas similares a MCR identificadas</i>	138
Apéndice G. <i>Resultados de InterProScan para la anotación de los genomas 25TBS y 33TXLD</i>	139
Apéndice H. <i>Contigs del genoma 33TXLD que alinearon con los genomas pESI de referencia y región de alineamiento (en pb)</i>	140
Apéndice I. <i>Resumen de los resultados del scaffolding de los contigs alineados con cada referencia del megaplásmido</i>	142
Apéndice J. <i>Orden y emparejamiento de los contigs en los scaffolds</i>	143
Apéndice K. <i>Alineamiento entre el plásmido pSE81-1705-3 y los contigs de 25TBS</i>	144
Apéndice L. <i>Patrón de resistencia del megaplásmido p33TXLD</i>	145
Apéndice M. <i>Características de virulencia y fitness del megaplásmido p33TXLD</i>	146

Apéndice N. <i>Tipificación plasmídica</i>	147
Apéndice O. <i>Elementos móviles del megaplásmido p33TXLD</i>	148
Apéndice P. <i>Proteínas conjugativas presentes en el megaplásmido p33TXLD</i>	149
Apéndice Q. <i>Patrón de resistencia de la cepa 33TXLD y cepas emergentes de S. Infantis</i> <i>MDR</i>	152
Apéndice R. <i>Comparación de los genes y sustituciones de resistencia antimicrobiana</i> <i>identificados con los diferentes programas de análisis</i>	153

Resumen

Título: Análisis genómico de dos aislamientos de origen alimentario de *Salmonella enterica* resistentes a colistina*

Autor: Pereira Cardeño Eliana Marcela**

Palabras claves: *Salmonella enterica*, resistencia antimicrobiana, colistina, secuenciación de genoma completo.

Descripción: *S. enterica* es uno de los principales patógenos transmitido por alimentos. El uso de antibióticos en animales de consumo humano ha contribuido a la aparición de *Salmonella* multirresistentes (MDR). En *Salmonella*, la resistencia a colistina es causada por sustituciones en los sistemas PmrA/B y PhoP/Q, y a través del gen de resistencia móvil a colistina (*mcr*). La secuenciación de genoma completo se usa cada vez más para la caracterización de *S. enterica*. El objetivo de este estudio fue analizar las características genómicas de dos *S. enterica* resistentes a colistina aisladas de pollo. El genoma completo de los aislamientos 25TBS y 33TXLD fue secuenciado. El control de calidad se realizó con FastQC, ensamblaje y anotación con Unicycler y Prokka. La genotipificación e identificación de determinantes de resistencia fue realizada usando SeqSero2, SISTR, MLST, ANI Calculator, PointFinder, ResFinder, Resistance Gene Identifier, ABRicate y Clustal Omega. El análisis de plásmidos fue hecho mediante plasmidVerify, viralVerify, PlasmidFinder, pMLST y PLSDB. El aislamiento 25TBS fue identificado como *S. enterica* ser. Newport ST2370 con genes y sustituciones que pueden conferir resistencia a aminoglucósidos, quinolonas, fosfomicinas, elfamicinas y polimixinas; además, se encontró el plásmido pSE81-1705-3. 33TXLD fue identificado como *S. enterica* ser. Infantis ST32, descrito como un clon emergente MDR asociado a aves de corral. Se detectaron determinantes de resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, diaminopirimidinas, fenicoles, fosfomicinas, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, elfamicinas, nitrofuranos y polimixinas. Se encontró un megaplásmido pESI con potencial conjugativo, y los plásmidos pSA20051401.5 y pSE81-1705-3. Ninguno de los aislamientos presentó genes *mcr*, mientras que los dos mostraron sustituciones en PmrA/B y PhoP/Q, así como genes modificadores del lipopolisacárido involucrados en la resistencia a colistina de origen cromosomal. En nuestro conocimiento este es el primer reporte de los secuenciotipos 32 y 2370, así como del megaplásmido de tipo pESI en *Salmonella* aislada de pollo en Colombia.

* Trabajo de Grado

** Universidad Industrial de Santander. Maestría en Microbiología. Director: Giovanna Rincón Cruz, Ph.D. Co-director: Diego Mauricio Riaño Pachón, Dr. rer. Nat.

Abstract

Title: Genomic analysis of two food-borne isolates of colistin resistant *Salmonella enterica*.

Author: Pereira Cardeño Eliana Marcela*

Key Words: *Salmonella enterica*, antimicrobial resistance, colistin, whole genome sequencing.

Description: *S. enterica* is one of the major foodborne pathogens. The use of antibiotics in food-producing animals has contributed to the emergence of multidrug-resistant (MDR) *Salmonella*. Whole genome sequencing is being increasingly used to characterize *S. enterica*. The goal of this study was to analyze the genomic characteristics of two colistin resistant *S. enterica* isolated from chicken. The whole genome of isolates 25TBS and 33TXLD was sequenced. Quality control was done using FastQC, assembly and annotation were performed by Unicycler and Prokka. Genotyping and resistance determinants identification were done using SeqSero2, SISTR, MLST, ANI Calculator, PointFinder, ResFinder, Resistance Gene Identifier, ABRicate and Clustal Omega. Plasmid analysis was done by plasmidVerify, viralVerify, PlasmidFinder, pMLST and PLSDB. 25TBS was identified as *S. enterica* ser. Newport ST2370 with genes and substitutions that could confer resistance to aminoglycosides, quinolones, fosfomicin, elfamycin and polymyxins; furthermore, it was found the plasmid pSE81-1705-3. 33TXLD was identified as *S. enterica* ser. Infantis ST32 with resistance determinants to aminoglycosides, beta-lactams, phenicol, fosfomicin, sulphonamides, tetracycline, quinolones, elfamycin, nitrofurans, and polymyxins. The pESI-like megaplasmid with conjugative potential, and the plasmids pSA20051401.5 and pSE81-1705-3 were found. None of the isolates carried *mcr* genes, while both showed substitutions in the PmrA/B and PhoP/Q systems, and lipopolysaccharide-modifying genes involved in colistin resistance by chromosomal mechanism. To our knowledge, this is the first report of sequence type 32 and 2370, and the pESI-like plasmid in *Salmonella* isolated from chicken in Colombia.

* Bachelor Thesis

** Universidad Industrial de Santander. Master in Microbiology. Director: Giovanna Rincón Cruz, Ph.D. Co-director: Diego Mauricio Riaño Pachón, Dr. rer. Nat.

Introducción

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos en patógenos bacterianos amenaza la respuesta efectiva de la salud pública global ante las enfermedades infecciosas (Pornsukarom & Thakur, 2017). La ausencia de nuevos antimicrobianos y el aumento de resistencia en bacilos Gram negativos (BGN) ha generado la reincorporación de colistina como último recurso de tratamiento contra BGN multirresistente (MDR, del inglés *Multidrug Drug Resistant*) o extensivamente resistentes (Giske, 2015; Olaitan et.al., 2014).

La colistina (polimixina E) es un antibiótico con actividad en el grupo de las Enterobacterias, *Acinetobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*, que actúa sobre el lípido A del lipopolisacárido (LPS), causa disrupción de la membrana externa y promueve la muerte celular (Bardet & Rolain, 2018; Giske, 2015). El aumento en el uso de colistina ha llevado a la aparición de resistencia en bacterias que normalmente son sensibles a este antibiótico (Olaitan et.al., 2014).

Hasta hace poco todos los mecanismos descritos de resistencia a colistina en las bacterias Gram negativas eran de origen cromosomal, mediados principalmente por los sistemas de dos componentes (TCS, del inglés *Two Component Systems*) PmrA/B y PhoP/Q. Sin embargo, en 2015 fue reportado el primer mecanismo de resistencia plasmídico denominado gen de resistencia móvil a colistina (*mcr-1*) (Liu et.al., 2016), posteriormente se detectaron los genes *mcr-2* a *mcr-9* (Bardet & Rolain, 2018). Al estar ubicado en un plásmido el gen *mcr* es transferible (Coetzee et.al., 2016), estos procesos de transferencia se consideran la principal razón de la rápida propagación de la resistencia a los antibióticos entre bacterias (Pornsukarom & Thakur, 2017).

Los métodos fenotípicos usados para detectar la resistencia a colistina presentan múltiples dificultades; en el caso de la resistencia mediada por plásmidos esto se debe a que una de las

principales características de los genes *mcr* es que confieren un bajo nivel de resistencia, cercana a los puntos de corte establecidos para este antibiótico. Adicionalmente, el gran número de mecanismos y genes involucrados en la resistencia a colistina ha dificultado su detección a través de métodos moleculares como la PCR (Bardet & Rolain, 2018). Por tanto, se hace necesario el uso de métodos que permitan una detección completa y precisa de los determinantes de resistencia a este antibiótico.

La colistina ha sido usada por décadas en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones y con fines profilácticos (Moulin et.al., 2016). El uso intensivo de antibióticos en los animales destinados a la producción de alimentos ha contribuido en la aparición de bacterias resistentes incluyendo aislamientos de *Salmonella* MDR, los cuales podrían ser transferidos a los humanos a través de la cadena alimentaria (Pornsukarom & Thakur, 2017; Rhouma et.al., 2016).

Una de las zoonosis de mayor prevalencia en el mundo es la causada por las bacterias del género *Salmonella*. Se considera que los alimentos son la principal fuente de exposición humana a este patógeno y se estima que el 95% de las infecciones están asociadas con alimentos de origen animal (Quesada et.al., 2016). Además de su clasificación en subespecies, el género *Salmonella* también es clasificado en serotipos con base en sus determinantes antigénicos principales. Para la identificación formal de un serotipo específico debe llevarse a cabo la serotipificación completa de todos los determinantes antigénicos de la bacteria, sin embargo, la mayoría de los laboratorios solo realizan reacciones de aglutinación simples con anticuerpos específicos contra los antígenos O con el fin de agrupar a *Salmonella* en seis grandes serogrupos (Eng et.al., 2015).

Con base en la resolución que ofrece, su capacidad de predicción de serovariedades y su mayor poder discriminatorio frente a otros métodos de subtipificación, la secuenciación de genoma completo (WGS, del inglés *Whole Genome Sequencing*) se considera el método más adecuado

para caracterizar aislamientos de *Salmonella* (Tang et.al., 2019). Así mismo la WGS, en combinación con herramientas bioinformáticas, permite la detección completa de genes de resistencia localizados tanto en el cromosoma bacteriano como en elementos genéticos móviles (Bardet & Rolain, 2018; Lomonaco et.al., 2018), por lo tanto, facilita la detección de múltiples tipos de resistencia a colistina y posibilita una mejor comprensión de los determinantes genéticos de resistencia a este antibiótico que la obtenida a través de métodos moleculares. (Osei Sekyere et al., 2016; Otter et.al., 2017).

Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo analizar las características genómicas de dos aislamientos de origen alimentario de *Salmonella enterica* resistentes a colistina a través de WGS.

1. Planteamiento del problema y Justificación

Actualmente, la resistencia a los antimicrobianos se considera una de las mayores amenazas para la salud pública global (European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)., 2019), debido a que disminuye la efectividad de los tratamientos de un gran número de infecciones llevando a enfermedades prolongadas, incapacidad y muerte (Lomazzi et al., 2019). Al menos 700.000 personas mueren anualmente a causa de la resistencia a los antimicrobianos a nivel mundial y se estima que para el año 2050, el número de muertes podría ser de diez millones por año (WHO - Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG), 2019).

En las últimas décadas se ha evidenciado una rápida aparición de bacterias Gram negativas MDR. Dicha resistencia se origina por sustituciones en genes bacterianos o por adquisición de genes de resistencia transportados por elementos genéticos móviles, que pueden ser diseminados horizontalmente entre bacterias. Las bacterias pueden adquirir múltiples mecanismos de resistencia y, por lo tanto, hacerse multirresistentes (EFSA & ECDC, 2019), es decir, resistentes a al menos un antibiótico en más de tres clases de antimicrobianos (Mathers et.al., 2015).

La colistina es un antimicrobiano catiónico de tipo peptídico el cual fue reintroducido como “último recurso” para el control de bacterias Gram negativas MDR (Cassir et al., 2014; Rhouma et al., 2016). Sin embargo, en los últimos años se ha detectado resistencia a este antibiótico entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp., aislados de alimentos, animales y humanos en muchas regiones del mundo (Pishnian et.al., 2019). Esta resistencia ha sido mediada principalmente por mecanismos cromosomales, y más recientemente se identificó el primer mecanismo de resistencia a colistina

mediado por plásmido, codificado por el gen *mcr* (*mobile colistin resistance*) (Al-Tawfiq et.al., 2017).

La importancia particular del incremento de resistencia a colistina radica en que actualmente este antibiótico representa la última línea de defensa contra infecciones por bacterias MDR, especialmente aquellas resistentes a carbapenémicos, limitando aún más las posibilidades de tratamiento. Además, la transferencia horizontal de genes a través de plásmidos puede diseminar más fácilmente la resistencia a este antibiótico entre bacterias y humanos que la resistencia a colistina que resulta de sustituciones a nivel cromosomal (ECDC, 2016).

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos es una consecuencia de múltiples factores, entre los que se destaca el uso inapropiado y a gran escala como promotor de crecimiento en la cría de animales (da Cunha et.al., 2019); como consecuencia, los alimentos de origen animal pueden albergar patógenos resistentes a los antibióticos y funcionan como un vehículo de diseminación de estos microorganismos a los humanos (Fardsanei et.al., 2017), en particular de Enterobacterias (Antonelli et.al., 2019). Esta transmisión ocurre durante la manipulación de los alimentos crudos, así como por la contaminación cruzada entre diferentes productos alimenticios durante la producción, distribución y manejo en el hogar (Jans et.al., 2018).

Salmonella es uno de los principales patógenos transmitidos por alimentos en el mundo (Realpe-Quintero et.al., 2018). Se estima que *Salmonella* no tifoidea (NTS, del inglés *Nontyphoidal Salmonella*) causa 93.8 millones de casos de gastroenteritis aguda, de los cuales aproximadamente el 85% son transmitidos por alimentos, resultando en 155.000 muertes anuales en el mundo. Por tanto, este patógeno tiene un impacto económico y de salud pública significativo en la sociedad (FAO & WHO, 2016). Las infecciones causadas por NTS se asocian al consumo de alimentos contaminados de origen animal, siendo los productos avícolas comerciales importantes

reservorios para este patógeno (Fardsanei et.al., 2017). El género *Salmonella* se clasifica en dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, de las cuales *S. enterica* representa la especie más patógena para humanos y animales e incluye seis subespecies divididas en más de 2.600 serovariedades caracterizadas hasta ahora (Jajere, 2019). La clasificación de aislamientos de *Salmonella* generalmente se realiza por serotipificación estándar siguiendo el esquema desarrollado por Kauffman y White, el cual se basa en los tres principales determinantes antigénicos: somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi) (Eng et.al., 2015).

Este método de serotipificación tiene varias desventajas frente a los antígenos O y H. La más importante de estas es que las pruebas de aglutinación solo pueden detectar antígenos O y H que se están expresando en el momento. En el caso del antígeno H, para inducir la expresión de los antígenos de segunda fase, los aislamientos necesitan pasar por diferentes medios, lo cual es un proceso largo y dispendioso. Otra desventaja radica en la gran cantidad de serovariedades descritas, lo que hace impráctico para los laboratorios contar con los más de 250 antisueros necesarios para lograr una caracterización serológica completa. Finalmente, la producción de estos antisueros no es un proceso sencillo y requiere un estricto control de calidad para evitar resultados falsos positivos (Uelze et.al., 2020).

Estas desventajas han impulsado el desarrollo de métodos moleculares para la serotipificación de *Salmonella*, sin embargo, estas técnicas aún se limitan a la identificación de una porción del total de serotipos existentes. Por su parte, la WGS permite una identificación rápida y costo-efectiva de aislamientos de *Salmonella*, usándose cada vez más para la tipificación y caracterización de patógenos transmitidos por alimentos (Cooper et.al., 2020). Las tecnologías de WGS se han convertido en una herramienta poderosa y accesible para la tipificación microbiana, alcanzando una mayor resolución que otros métodos de tipificación tradicional como

el análisis multilocus de número variable de repeticiones en tándem y la electroforesis en gel de campo pulsado (Oniciuc et.al., 2018). Este alto grado de resolución permite diferenciar cepas estrechamente relacionadas y definir relaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos bacterianos (Carrillo et.al., n.d.).

Además de la serotipificación, la determinación del perfil de sensibilidad representa un aspecto fundamental dentro de la caracterización de aislamientos de *Salmonella*; especialmente por el incremento de aislamientos multirresistentes, como *Salmonella enterica* ser. Newport¹, *Salmonella enterica* ser. Heidelberg y *Salmonella enterica* ser. Infantis, comúnmente asociados con productos alimenticios de origen avícola (Cooper et.al., 2020; European Food Safety Authority (EFSA) & ECDC, 2016; Oniciuc et.al., 2018). Se han recuperado aislamientos de *Salmonella* MDR de granjas avícolas y productos cárnicos de aves con resistencia a estreptomicina, gentamicina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol (EFSA & ECDC, 2016; Nair et.al., 2018). También han sido aislados de alimentos, *Salmonella* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (Zhang et al., 2018), y *Salmonella* resistentes a importantes antibióticos clínicos como fluoroquinolonas (Jajere, 2019) y colistina; la resistencia a este último antibiótico ha sido reportada en diferentes países de mundo, incluyendo Colombia (Al-Tawfiq et.al., 2017; Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima)., 2017; Neuert et.al., 2018).

Los análisis estándar de sensibilidad bacteriana están basados en diferentes métodos fenotípicos, tales como microdilución en caldo o métodos de difusión en disco, los cuales son

¹ Nomenclatura usada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en la que se indica género, subespecie, serovariedad y cepa, si corresponde. Para efectos prácticos en algunas partes del documento se utilizará una nomenclatura abreviada formada por la inicial del género y la serovariedad

posteriormente interpretados siguiendo diferentes guías estandarizadas. Sin embargo, estas técnicas no proveen información sobre los determinantes genéticos de resistencia o su asociación con elementos genéticos móviles que facilitan su diseminación (Oniciuc et.al., 2018). En particular, la estandarización de la prueba de sensibilidad antimicrobiana a colistina ha sido retardadora debido a propiedades inherentes del antibiótico como su naturaleza catiónica, su afinidad por el plástico y su pobre difusión en agar, lo que hace poco confiable el uso de métodos tradicionales como dilución en agar y difusión en disco o en gradiente (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2016; Turlej-Rogacka et.al., 2018).

El uso de la WGS puede superar estas limitaciones, permitiendo la detección de determinantes de resistencia antimicrobiana y el contexto genómico de los mismos (Oniciuc et.al., 2018). Además, esta técnica ofrece la posibilidad de detectar genes de resistencia a compuestos que no son probados rutinariamente por el método fenotípico y de diferenciar bacterias que tienen patrones de resistencia idénticos causados por diferentes mecanismos (McDermott et.al., 2016). Gracias a esta revolución genómica, actualmente se puede acceder a miles de secuencias del genoma completo de una amplia gama de bacterias patógenas. Esta disponibilidad permite utilizar enfoques bioinformáticos para estudiar la adquisición y propagación de resistencia a los antimicrobianos (Monk, 2019).

En el caso particular de *Salmonella*, la secuenciación de aislamientos resistentes ha crecido a un ritmo muy rápido, aumentando en gran medida el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia presentes en este patógeno (Cuypers et.al., 2018; McDermott et.al., 2016). La implementación de la WGS en *Salmonella* ha permitido obtener información definitiva sobre las fuentes de los aislamientos resistentes, los tipos específicos de genes y sustituciones involucrados, así como de los mecanismos de propagación de la misma (McDermott et.al., 2016).

Con base en lo expuesto anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los genotipos, los determinantes de resistencia y los plásmidos que caracterizan a dos aislamientos de *Salmonella enterica* de matriz de pollo resistentes a colistina?

2. Marco Conceptual y Estado del Arte

2.1 Género *Salmonella*

Salmonella es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Eng et.al., 2015). *Salmonella* representa un género muy diverso de importancia global para la salud pública por ser uno de los principales patógenos alimentarios causantes de miles de muertes en todo el mundo (Jajere, 2019).

Con base en sus propiedades bioquímicas y relación genómica, la especie *S. enterica* se clasifica en seis subespecies (Jajere, 2019), de las cuales *S. enterica* subsp. *enterica* (I) es la más común, siendo responsable del 99% de los casos de salmonelosis en humanos y animales, y puede ser subdividida en *Salmonella* tifoidea y *Salmonella* no tifoidea. NTS puede ser transferida de animales a humanos principalmente a través de alimentos contaminados, causando una infección zoonótica, denominada salmonelosis. Esta infección generalmente se caracteriza por una gastroenteritis autolimitada, sin embargo, puede presentarse como enfermedad invasiva con bacteriemia y otras infecciones extraintestinales en grupos de riesgo (Neuert et.al., 2018).

Así mismo, *S. enterica* ha sido subdividida en serovariedades con base en reacciones diferenciales de anticuerpos. La identificación de distintos antígenos de la superficie celular en lipopolisacáridos y flagelos ha llevado a la identificación de más de 2.600 serovariedades que

difieren en sus fórmulas antigénicas (Alikhan et.al., 2018). Muchas de estas serovariedades pueden causar enfermedad tanto en humanos como en animales (Jajere, 2019).

2.2 Resistencia en *Salmonella*

De particular importancia es el aumento de la prevalencia y resistencia de *S. enterica*, siendo la mayoría de los serotipos de origen animal, resistentes a múltiples antibióticos (Fardsanei et.al., 2017). La mayoría de las infecciones por *Salmonella* MDR en humanos son adquiridas por ingestión de alimentos contaminados de origen animal como cerdo, pollo y productos derivados como los huevos (Jajere, 2019). Después del consumo de alimentos contaminados, las bacterias comensales y patógenas en el intestino pueden intercambiar elementos genéticos móviles que median la resistencia (Mąka & Popowska, 2016).

En la década de los 80, el uso cada vez mayor de antibióticos de primera línea como ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina condujo rápidamente a la aparición de aislamientos de *S. enterica* ser. Typhimurium resistentes a estos antimicrobianos. La resistencia a las fluoroquinolonas, introducidas para lidiar con la resistencia a los antibióticos de primera línea, se desarrolló como consecuencia del uso veterinario de enrofloxacin. De forma similar, desde los años 90, se han detectado aislamientos de NTS resistentes a cefalosporinas de espectro extendido (Neuert et al., 2018). Recientemente, la prevalencia de *Salmonella* resistente a antibióticos de importancia clínica como fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación ha incrementado, convirtiéndose en un problema emergente en todo el mundo (Jajere, 2019). Así mismo, se ha detectado resistencia adquirida a colistina en NTS (Neuert et.al., 2018).

El desarrollo de resistencia antimicrobiana entre patógenos alimentarios como *Salmonella* ha sido asociado con mayor tiempo de hospitalización, mayor riesgo de enfermedad invasiva,

incremento de mortalidad y altos costos de tratamiento debido a fallas terapéuticas (Mąka & Popowska, 2016).

2.2.1 Resistencia a colistina en *Salmonella*

La colistina es un antibiótico catiónico que pertenece a la familia de las polimixinas. A partir de los años 70 su uso en humanos fue suspendido debido a reportes de altos índices de neurotoxicidad y nefrotoxicidad; sin embargo, continuó siendo utilizado en medicina veterinaria. Su mecanismo de acción se relaciona principalmente con la unión a los lipopolisacáridos de la membrana de los BGN, llevando a una perturbación en la permeabilidad de la misma y finalmente a muerte celular (Rhouma et.al., 2016).

Debido a la escasez de nuevos antibióticos para tratar infecciones por bacterias MDR, colistina fue reintroducido como opción terapéutica (Anyanwu et al., 2020; Trimble et.al., 2016). Sin embargo, muy rápidamente surgieron los primeros reportes de resistencia a colistina en todo el mundo (Duval et.al., 2019), y en la última década se han encontrado con mayor frecuencia bacterias Gram negativas de origen animal resistentes a este antibiótico, siendo los animales destinados a la producción de alimentos uno de los principales reservorios para la propagación de dicha resistencia (Rhouma et.al., 2016).

Un estudio realizado por la EFSA (*European Food Safety Authority*) encontró 8,3% de aislamientos resistentes a colistina procedentes de pollos de engorde en la Unión Europea, en una gran diversidad de serovariedades de *Salmonella* (Moulin et.al., 2016; EFSA & ECDC, 2016).

El principal mecanismo que usan las bacterias para protegerse de los antimicrobianos peptídicos como colistina es la alteración del LPS; dicha alteración se logra mediante modificaciones covalentes del lípido A, sobre todo a través de la unión de fosfoetanolamina (PetN)

y 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara4N), lo que disminuye la carga neta negativa del lípido A, reduciendo la unión del antimicrobiano, conduciendo a la resistencia (Olaitan et.al., 2014).

En *Salmonella*, las modificaciones del lípido A son causadas principalmente por sustituciones no sinónimas en los TCS PmrA/B y PhoP/Q. Estas sustituciones llevan a la sobreexpresión de estos sistemas, resultando en la activación de los operones *arnBCADTEF* y *pmrCAB*, y la modificación del lípido A con L-Ara4N y PEtN, respectivamente (Olaitan et.al., 2014). Se han descrito numerosas sustituciones en los genes y operones implicados en la modificación del LPS mayormente en *S. Newport* y *S. Typhimurium* (Aghapour et.al., 2019; Olaitan et.al., 2014, 2015; Sun et.al., 2009).

Además de las modificaciones con L-Ara4N y PEtN, otras alteraciones del lípido A que han sido asociadas con la resistencia a polimixinas son la deacilación causada por la proteína PagL, la hidroxilación mediante LpxO y la inhibición de la LpxT por parte de la proteína PmrR. Sumado a lo anterior, las proteínas EptC (CptA) y EptB modifican el *core* del LPS mediante la adición de PEtN, y la proteína PmrG se encarga de la desfosforilación del mismo (Kawasaki, 2012; Olaitan et.al., 2014).

Más recientemente se describió el primer mecanismo plasmídico de resistencia a colistina, denominado *mcr-I* el cual codifica para la fosfoetanolamina transferasa, esta enzima adiciona PEtN al lípido A, modificando su carga (Aghapour et.al., 2019). Desde la aparición de este gen se han identificado, en un gran número de países, diferentes variantes en *Salmonella* y otras enterobacterias aisladas de humanos, animales y alimentos (Aghapour et.al., 2019; Al-Tawfiq et.al., 2017; Garcia-Graells et.al., 2018; Littrup et.al., 2017). En Latinoamérica se ha registrado una alta frecuencia de aislamientos *mcr* positivo, especialmente en Brasil, Colombia y Argentina, con una prevalencia del 5,4% en bacterias aisladas de alimentos, siendo *S. Typhimurium* una de las

Tabla 1

Serovariedades de S. enterica con variantes mcr aisladas de carne de pollo.

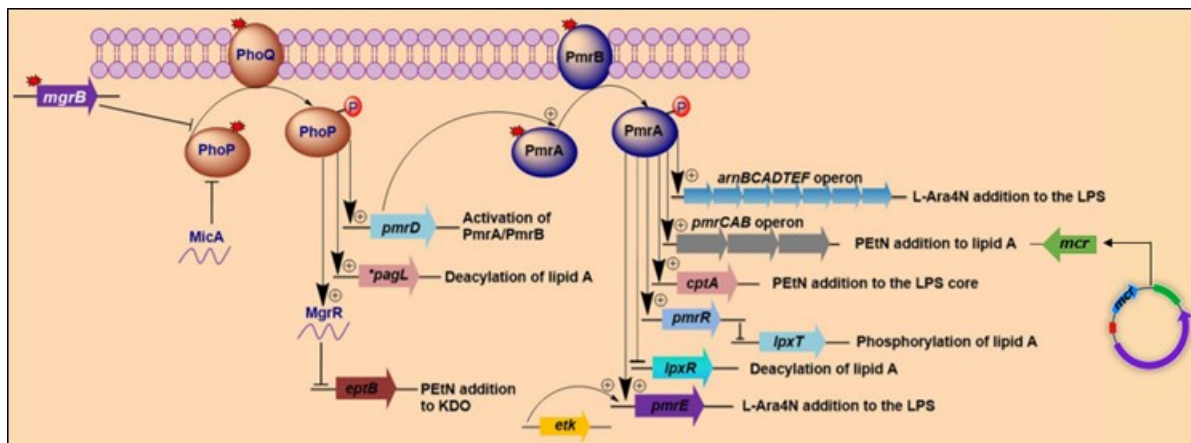
Gen <i>mcr</i>	Aislamiento de <i>S. enterica</i>	Referencia
<i>mcr-1</i>	<i>S. Schwarzengrund</i> , <i>S. Paratyphi</i> B, <i>S. Newport</i> , <i>S. Typhimurium</i> ¹ , <i>S.</i> Give ²	(Doumith et al., 2016) (Borowiak et al., 2020) (Saavedra et al., 2017) (Invima, 2017)
<i>mcr-3</i> y <i>mcr-4</i>	<i>S. Typhimurium</i>	(Sia et al., 2020) (Borowiak et al., 2020)
<i>mcr-5</i>	<i>S. Paratyphi</i> B y <i>S. Typhimurium</i>	(Borowiak et al., 2017) (Borowiak et al., 2020)
<i>mcr-9</i>	<i>S. Paratyphi</i> B	(Borowiak et al., 2020)

¹ Aislamientos de muestras humanas y de carne cruda y chorizo. ² Aislamientos de carne cruda y chorizo.

En la Figura 1 se observa los genes modificadores de lipopolisacárido implicados en la resistencia a la polimixina en bacterias Gram negativas.

Figura 1.

Genes modificadores del LPS implicados en la resistencia a la polimixina en bacterias Gram negativas.



Nota: Las sustituciones que llevan a la inducción constitutiva de los TCS se denotan con símbolos de estrella color rojo. Adaptado de Olaitan et al., 2014.

2.3 Caracterización de *Salmonella* por secuenciación de genoma completo

La creciente accesibilidad de la WGS ha resultado en la factibilidad de la secuenciación bacteriana completa en laboratorios clínicos y de alimentos. Esto ha llevado al desarrollo de una serie de herramientas bioinformáticas para predecir fenotipos bacterianos, incluidos los perfiles de resistencia antimicrobiana y las serovariedades (Cooper et.al., 2020).

Este método ha sido cada vez más usado para la caracterización de patógenos transmitidos por alimentos como *Salmonella* (Cooper et.al., 2020). Zankari *et al.*, 2013 utilizaron la WGS para caracterizar los perfiles de sensibilidad de 200 aislamientos bacterianos (*S. Typhimurium*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*) de cerdos, demostrando una concordancia del 99,74% entre los resultados *in silico* y el perfil de sensibilidad fenotípico (Oniciuc et.al., 2018). De forma similar, analizaron 3.491 aislamientos de *S. enterica* no tifoidea de brotes alimentarios por secuenciación de genoma completo, para identificar genes y sustituciones cromosomales causantes de resistencia fenotípica a 15 antimicrobianos, reportando concordancia del 99,83% entre fenotipo y genotipo detectado (Neuert et.al., 2018).

La WGS permite un tamizaje completo de los genes *mcr* y de sustituciones cromosomales conocidas que confieren resistencia a colistina (Gogry et.al., 2021). Mediante el uso de esta tecnología, se describió por primera vez el gen *mcr-1* en aislamientos de enterobacterias en China (Liu et.al., 2016). Algunas de las variantes de este gen se identificaron por primera vez en aislamientos de *Salmonella* mediante la secuenciación de genoma completo; tal es el caso del gen *mcr-4* y *mcr-9* identificado en *S. Typhimurium* y *mcr-5* detectado en *S. Paratyphi B* (Borowiak et.al., 2017; Carattoli et.al., 2017; Carroll et.al., 2019). Por su parte, Sia *et al.*, 2020 realizaron la

caracterización de genes *mcr* en 33.000 genomas de *S. enterica* obtenidos de humanos, animales, alimentos y ambiente, detectando la presencia de este gen en nuevos plásmidos (*mcr-3* y *mcr-5*) e integrados en el cromosoma (*mcr-1* y *mcr-5*.)

Dentro de las sustituciones cromosomales que confieren resistencia a colistina que han sido identificadas mediante WGS, Wang et.al., 2018 reportaron 28 sustituciones relacionadas con los sistemas PmrA/B y PhoP/Q, causantes de modificaciones del lípido A en una cepa *S. Typhimurium* WW012 aislada de cerdo.

Una de las grandes ventajas del uso de la WGS en la identificación y caracterización de patógenos bacterianos es la posibilidad de detectar diferencias de un solo nucleótido en el genoma, lo que permite la distinción de cepas altamente clonales. El genotipado de *Salmonella* basado en esta técnica está reemplazando los métodos tradicionales y ha demostrado ser muy efectivo en estudios de brotes alimentarios, predicción de resistencia antimicrobiana y elucidación de la evolución de algunos subtipos de *Salmonella* (Ferrari et.al., 2017).

La determinación fenotípica de serovariedades de *Salmonella* es costosa debido a la gran cantidad de antisueros y antígenos con los que se debe contar; además, la clasificación final de serovariedades complejas requiere múltiples reacciones graduales de aglutinación. Por lo tanto, este método toma mucho tiempo y es laborioso. Otra desventaja es que la serotipificación tradicional puede ser imprecisa y tiene un bajo poder discriminatorio en los serotipos convencionales. Por lo anterior, la determinación *in silico* de serovariedades a través de la WGS se ha convertido en uno de los enfoques más utilizados (Tang et.al., 2019).

Estudios que comparan la serotipificación por serología tradicional con la obtenida a través de WGS como el realizado por Ibrahim & Morin, 2018, en 1041 aislamientos de *Salmonella* de alimentos, piensos e hisopados ambientales, encontraron que ambos métodos predicen serotipos

de *Salmonella* idénticos en 899 aislamientos (86,4%). Además, el estudio permitió detectar características moleculares y genéticas que no pueden ser obtenidas por el método serológico tradicional. Así mismo, esta tecnología ha sido utilizada en la identificación de *Salmonella* en estudios de vigilancia en salud pública, como el realizado por Ashton *et.al.*, 2016, quienes compararon la serovariedad obtenida por WGS con el serotipo fenotípico en aislamientos de *S. enterica* de casos de gastroenteritis humana, encontrando una concordancia del 96% entre los dos métodos, lo que muestra que la identificación por WGS es un método de tipificación de alto rendimiento, preciso, robusto y confiable.

Dentro de las múltiples herramientas bioinformáticas disponibles para el análisis de los datos obtenidos de la WGS, y que fueron utilizadas en este proyecto, se encuentra el *software* SPAdes el cual utiliza un método basado en *k-mers* para construir grafos de *De Bruijn* (Bankevich et al., 2012); así como el *software* Unicycler que funciona como un optimizador de SPAdes cuando trabaja únicamente a partir de lecturas cortas (Wick et al., 2017). Para analizar la calidad de los ensamblajes se cuenta con herramientas como QUAST el cual genera múltiples métricas técnicas (Gurevich et al., 2013), y el *software* BUSCO mediante el cual se realiza una comparativa de los ortólogos de copia única presentes en los genomas de estudio (Manni et al., 2021).

Con respecto a los recursos para la tipificación, la plataforma EzBioCloud contiene la herramienta *ANI Calculator* con la cual se obtiene el promedio de identidad de nucleótico para identificar y clasificar bacterias mediante el análisis comparativo de genomas (Yoon et al., 2017); así mismo existen programas de serotipificación específicos para el género *Salmonella* tales como SISTR que usa la matriz de genoserotipificación SGSA y el esquema MLST del genoma *core*, y el programa SeqSero2 que contiene bases de datos de antígenos O y H, se estima que puede identificar más de 2300 de las serovariedades descritas para *Salmonella enterica* (S. Zhang et al.,

2019). Para la asignación del secuenciotipo existen herramientas como MLST 2.0 (Larsen et al., 2012) que utiliza un método de tipificación basado en BLAST para determinar el perfil alélico de la secuencia dada.

De modo similar existen diversos programas para la identificación de determinantes de resistencia, entre los que se encuentra ResFinder el cual usa BLAST para identificar genes de resistencia adquiridos y/o mutaciones cromosomales (PointFinder) a partir de datos de secuenciación de las plataformas Illumina, Roche 454, Ion-torrent y SOLiD (Zankari et al., 2012); el *software Resistance Gene Identifier* que predice resistomas a partir de datos de nucleótidos o proteínas basándose en modelos de homología y en *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) (Alcock et al., 2020), y ABRicate que permite la identificación de *contigs* de genes de resistencia antimicrobiana (Seemann, 2019).

Del mismo modo se han desarrollado numerosas herramientas para el estudio de plásmidos a partir de datos de secuenciación masiva, dentro de las que se encuentran: el algoritmo plasmidSPAdes el cual utiliza la cobertura de los *contigs* para distinguir entre plásmidos y cromosomas (Antipov et al., 2016), bases de datos como PLSDB que contiene más de 34000 secuencias de plásmidos (Galata et al., 2019), y PlasmidFinder para la identificación de replicones plasmídicos y asignación de grupos de incompatibilidad (Carattoli et al., 2014).

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente proyecto se propone utilizar la WGS para caracterizar dos aislamientos de origen alimentario de *Salmonella enterica* resistentes a colistina.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Analizar las características genómicas de dos aislamientos de origen alimentario de *Salmonella enterica* resistentes a colistina.

3.2 Objetivos específicos

Determinar el genotipo de dos aislamientos de *Salmonella enterica* mediante secuenciación de genoma completo.

Identificar potenciales determinantes de resistencia a colistina y genes de resistencia acompañante en dos aislamientos de *Salmonella enterica*.

Determinar la presencia de plásmidos e identificar si estos son de tipo conjugativo.

4. Metodología

4.1 Aislamientos

Los aislamientos de *Salmonella enterica* del presente trabajo identificados como 25TBS y 33TXLD fueron seleccionados a partir de una población total de 150 aislamientos obtenida de 100 muestras de pollo crudo colectadas en plazas de mercado de la ciudad de Barrancabermeja, Colombia como parte del proyecto titulado “Determinación de genes de virulencia y resistencia a quinolonas en aislamiento de *Salmonella* spp. de alimentos de origen animal” financiado por MinCiencias (código 110274455994). Los dos aislamientos fueron seleccionados por presentar resistencia a colistina mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo el protocolo del M07-A10 *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2015)*. Los aislamientos hacen parte de la colección bacteriana de la Escuela de Microbiología de la UIS.

4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN total se realizó por medio del kit DNeasy® (Qiagen, EUA) a partir de un cultivo bacteriano de 24 horas a 37 °C en Caldo Tripticasa Soya (Cat. 146439; Merck, Alemania) siguiendo las indicaciones del proveedor. La concentración de ADN fue evaluada usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, EUA).

4.3 Secuenciación

Se obtuvieron 403.5 ng/uL de ADN en un volumen de 45 uL del aislamiento 25TBS y 420.6 ng/uL de ADN en un volumen de 45 uL del aislamiento 33TXLD, para construir librerías con el kit TruSeq DNA PCR-free (550 pb *insert*), las cuales fueron secuenciadas en un equipo

Novaseq 6000 de Illumina usando química de lecturas pareadas de 150 pb de longitud hasta una cobertura aproximada de 400x. La secuenciación fue realizada por MacroGen, Inc.

4.4 Análisis bioinformático

Para el procesamiento de los datos de la secuenciación del genoma completo, se contó con los servicios y las plataformas del grupo de Supercomputación y Cálculo Científico UIS (SC3-UIS). A continuación, se describe el protocolo que se siguió para el análisis bioinformático de las secuencias.

4.4.1 Control de calidad, ensamblaje y anotación

Para evaluar la calidad de los datos se utilizó el programa FastQC v0.11.9 (Andrews, 2020). A partir de los resultados obtenidos en cada uno de los 11 módulos de análisis se evaluó la calidad de las lecturas y se definió si debían ser filtradas o no.

El ensamblaje *de novo* de cada genoma se realizó mediante el *software* SPAdes v3.13 (Bankevich et.al., 2012), usando las opciones *-careful* y *--threads 1*, y el ensamblador de genomas bacterianos Unicycler v0.4.7 (Wick et.al., 2017) con las opciones *--keep 1*, *--threads 20*, *--depth_filter 0.10*, *--start_genes* (secuencia del gen *dnaA*, acceso ENA ACF61138.1 para 25TBS y EHB40383.1 para 33TXLD), *--start_gene_id 90.0*, *--start_gene_cov 95.0*, *--makeblastdb_path* y *--min_polish_size 10000*. El *software* Pilon v1.23 (Walker et.al., 2014) se utilizó para pulir el ensamblaje obtenido de SPAdes, con el ensamblaje de Unicycler esto no fue necesario porque ya incluye este paso.

La contigüidad de los ensamblajes obtenidos se evaluó mediante la herramienta QUAST v5.0.2 (Gurevich et.al., 2013) usando las opciones *--split-scaffolds* y *--conserved-genes-finding*, y el *software* BUSCO v5.1.2 (Manni et.al., 2021) se utilizó para evaluar la completitud del espacio génico de los genomas indicando *enterobacterales odb10* como conjunto de datos y el modo

genoma. Las métricas que se tuvieron en cuenta para la selección del ensamblaje fueron el porcentaje de fracción del genoma en comparación con el genoma de referencia, el número de *contigs*, la longitud total y el N50 del mismo, los *misassemblies* (errores de ensamblaje) y el porcentaje de genes BUSCO completos.

Para asegurar la calidad de los ensamblajes se realizó la comparación con varios genomas de referencia, seis para 25TBS y siete para 33TXLD. Estos genomas de comparación fueron seleccionados de las bases de datos *RefSeq* (*NCBI Reference Sequence*) y GenBank, procurando que la secuencia depositada se encontrara completa, que el método de secuenciación generara lecturas largas, que fueran aislamientos de origen alimentario y que pertenecieran a la misma serovariedad de los aislamientos de estudio.

Los *contigs* con *misassemblies* putativos detectados con QUAST fueron alineados con los genomas de referencia completos utilizando Mashmap v2.0 (Jain et.al., 2018) para identificar la región del *misassembly*. A continuación, se empleó el programa Nucmer v3.1 de MUMmer (Marçais et.al., 2018) para alinear las regiones identificadas por Mashmap con los genomas de referencia.

Los genomas de los aislamientos de estudio fueron anotados usando Prokka v1.14 (Seemann, 2014).

4.4.2 Tipificación molecular

4.4.2.1 Serovariedad. La determinación de la serovariedad de los aislamientos se realizó a partir de los genomas ensamblados (*contigs*) utilizando los métodos descritos a continuación.

4.4.2.1.1 Análisis comparativo de genomas. Mediante el programa ContEst16S (Lee et.al., 2017) se identificó la secuencia del gen 16S rRNA, dicha secuencia fue usada para determinar los genomas con mayor similitud mediante la herramienta 16S-based ID (Yoon et.al., 2017) teniendo en cuenta solo *hits* con similitud > 98.7%; con estos genomas se construyó una base de datos de 98 secuencias de cepas tipo y aislamientos de origen animal para el posterior análisis comparativo. Finalmente se calculó el ANI (del inglés *Average Nucleotide Identity*) de los genomas de estudio contra cada uno de los genomas de la base de datos utilizando *ANI Calculator* (Yoon et.al., 2017) y se seleccionó el genoma con mayor similitud a cada uno de los genomas de estudio. Los tres programas usados en este método hacen parte de la plataforma EzBioCloud <https://www.ezbiocloud.net/>

4.4.2.1.2 Determinación directa. Se utilizaron los programas SISTR v.1.1.1 (Yoshida et.al., 2016) y SeqSero2 v.1.1.0 (S. Zhang et al., 2019) para la determinación directa de la serovariedad, estos programas identifican los genes que codifican el antígeno O (*cluster* de genes *rfb*) y H (genes *fliB* y *fliC*).

4.4.2.2 Secuenciotipo. El secuenciotipo de los aislamientos se obtuvo utilizando el programa MLST 2.0 (Larsen et.al., 2012) disponible en la página del CGE <https://www.genomicepidemiology.org/> usando como *input* el genoma ensamblado (*contigs*).

4.4.3 Identificación determinantes de resistencia antimicrobiana

Para garantizar un análisis completo de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos se usaron herramientas como ResFinder v3.2 y PointFinder para la identificación de genes de resistencia adquirida y mutaciones puntuales cromosomales, respectivamente (Zankari et.al., 2012), *Resistance Gene Identifier* v3.0.9 (RGI) que hace parte de la base de datos CARD (Alcock et.al., 2020) y ABRicate v1.0.1 (Seemann, 2019) que permite el *screening* de genes de

resistencia y virulencia, usando las bases de datos NCBI AMRFinderPlus (Feldgarden et.al., 2019), ResFinder, CARD y MEGARes (Doster et.al., 2020). Los análisis anteriormente mencionados fueron realizados a partir de los *contigs* obtenidos en el ensamblaje de cada genoma. En PointFinder y ResFinder se estableció como porcentaje mínimo de identidad 90% y de longitud 80%. Para la búsqueda en ABRicate el porcentaje mínimo de identidad establecido fue $> 95\%$, y en RGI se tuvieron en cuenta aquellos genes cuyo *Bitscore* fuera superior al *Pass_Bitscore* y que tuvieran un porcentaje de identidad $> 90\%$.

Además de la búsqueda en las bases de datos anteriormente mencionadas, para evaluar la presencia de genes *mcr* se realizó una búsqueda de variantes de este gen descritas recientemente en la literatura y se incorporaron dichas secuencias en una base de datos creada en ABRicate, denominada *colistindatabase*.

Sumado a lo anterior, se realizó la búsqueda de dominios proteicos similares a los dominios de la proteína MCR mediante el programa InterProScan v5.50-84.0 (Jones et.al., 2014), a partir de las proteínas predichas con Prokka. Se comparó la arquitectura de los dominios encontrados con dominios de proteínas asociadas con la resistencia a colistina reportadas en la literatura, que estuvieran plenamente caracterizadas (Apéndice F). Posteriormente aquellas proteínas que presentaron los dominios de una transferasa de fosfoetanolamina fueron alineadas con las proteínas de codificación cromosomal y plasmídica asociadas a la resistencia a colistina de aislamientos sensibles y resistentes a este antibiótico (Apéndice F) para conocer su porcentaje de identidad y diferenciar la transferasa de fosfoetanolamina plasmídica de la cromosomal en los genomas de estudio.

La búsqueda de sustituciones en las proteínas de codificación cromosomal asociadas con la resistencia a colistina (PmrA, PmrB, PhoP y PhoQ) fue también evaluada mediante el

alineamiento de las proteínas predichas en la anotación (archivo *gbk*) con las proteínas correspondientes en los genomas de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2, *Salmonella enterica* ser. Typhi CT18 y *Salmonella enterica* ser. Infantis 1326/28 reportados en la literatura para este fin (Jovčić et.al., 2020; Olaitan et.al., 2015; Sun et.al., 2009; Wang et.al., 2018). De igual manera se evaluó la presencia de estas sustituciones en las proteínas PmrC y PmrD descritas por Wang et.al., 2018 usando los genomas de referencia mencionados anteriormente. Los alineamientos fueron realizados usando el programa Clustal Omega disponible en UniProt (The UniProt Consortium, 2021).

4.4.4 Caracterización plasmídica

Para la exploración de los plásmidos en los genomas de estudio se utilizó el *pipeline* plasmidSPAdes v3.15.0 (Antipov et.al., 2016) usando las opciones *–careful* y *--threads 1*.

Búsqueda de plásmidos. Los *misassemblies* reportados por QUAST fueron analizados en busca de posibles plásmidos. Para tal fin los *contigs* con presencia de *misassemblies* fueron alineados contra las referencias utilizadas en QUAST usando Mashmap, de modo que se identificaran los tipos de *misassemblies* y la ubicación en el *contig*.

Con el fin de visualizar mejor y comprobar la presencia de las regiones con *misassemblies*, estas fueron alineadas con los genomas de referencia usando el programa Nucmer. Posteriormente se revisó la anotación de aquellos *contigs* que presentaron regiones de no alineamiento (*gaps*) frente a todas las referencias usadas. Los *contigs* con características plasmídicas fueron alineados usando Nucmer con genomas plasmídicos similares reportados en la literatura pertenecientes a la serovariedad del aislamiento (Tabla 18). Del mismo modo se realizaron alineamientos con Nucmer entre el genoma completo ensamblado y los genomas plasmídicos de referencia en busca de identificar todos los *contigs* que conforman los posibles plásmidos identificados (Apéndice H).

Con el fin de ordenar y conectar los *contigs* que alinearon con los plásmidos de referencia se realizó *scaffolding* mediante la herramienta SSPACE v.2.0 (Boetzer et.al., 2011) mapeando las lecturas contra estos *contigs*, indicando los parámetros *-m 32, -o 20, -t 0, -k 5, -a 0.70, -n 15, -p 0, -v 0, -z 0, -g 0, -T 1 y -p 1*.

Finalmente, para obtener un porcentaje global de identidad con el genoma de referencia, se realizó un análisis comparativo de genomas entre los *contigs* que alinearon con las referencias y cada uno de los plásmidos de referencia usando la herramienta *ANI calculator*.

La caracterización del posible plásmido identificado se realizó mediante una revisión en Prokka de los genes anotados en los *contigs* que lo conforman y se evaluó la presencia de las principales características descritas para los plásmidos de referencia. La anotación del plásmido identificado, así como la comparación con los plásmidos de referencia fue graficada mediante la herramienta de genómica comparativa *CGView Server*.

Adicionalmente, para la búsqueda de plásmidos se utilizaron dos estrategias más que consistieron en la selección de *contigs* plasmídicos y la detección de plásmidos mediante la base de datos PLSDB v.2020_11_19 (Galata et.al., 2019), las cuales se describen a continuación.

4.4.4.1. Selección de *contigs* plasmídicos. Se realizó la selección y verificación de los *contigs* resultantes de SPAdes, Unicycler y plasmidSPAdes mediante plasmidVerify (Antipov et.al., 2019), usando los parámetros por defecto, y viralVerify (Antipov et al., 2020), indicando el argumento *-p* para obtener la predicción de plásmidos. Posteriormente se realizaron alineamientos entre los *contigs* de los tres ensambladores usando el alineador Nucmer v3.1 de MUMmer (Marçais et.al., 2018) con el fin de establecer la correspondencia o las regiones de correspondencia entre *contigs* clasificados como plasmídicos por los diferentes programas. Así mismo, estos *contigs* fueron comparados con los encontrados en los alineamientos con los plásmidos de referencia (megaplásmidos) con el fin de evaluar si se trataba de los mismos.

La clasificación de *contigs* plasmídicos también fue llevada a cabo mediante análisis de variación de profundidad. Para tal fin se calculó la desviación estándar a partir de la profundidad de los *contigs* obtenidos con SPAdes y Unicycler, y se consideraron como posibles *contigs* plasmídicos aquellos con profundidad mayor a dos desviaciones estándar. Finalmente se revisó el resultado de la anotación obtenida por Prokka para cada uno de estos *contigs*.

4.4.4.2 Detección de plásmidos por PLSDB. Se utilizó la base de datos PLSDB para evaluar la presencia de plásmidos por medio de la estrategia de búsqueda *mash screen* con los parámetros *max_pvalue* = 0.1, *min_ident* = 0.99, *winner_takes_all* = true. Lo anterior se realizó a partir del ensamblaje del genoma completo de los dos aislamientos, y en el caso del aislamiento 33TXLD, también se realizó usando los *contigs* que forman el megaplásmido previamente mencionado en la sección 4.4.4.1. Los plásmidos encontrados en el genoma 33TXLD, que también hubieran sido reportados a partir de los *contigs* del megaplásmido, no fueron tenidos en cuenta para los análisis posteriores. Para identificar los *contigs* en los que alinean los plásmidos, se construyó una base de datos con las secuencias de los plásmidos identificados a partir del ensamblaje completo de cada aislamiento y se alineó con el respectivo ensamblaje. En el caso del genoma 33TXLD se tuvieron en cuenta aquellos plásmidos que alinearon solo con *contigs* diferentes a los que conforman el megaplásmido, con el fin de evaluar la presencia de plásmidos adicionales.

4.4.4.3 Tipificación plasmídica. La identificación del grupo de incompatibilidad se llevó a cabo mediante el programa PlasmidFinder v2.1 y el perfil alélico se determinó usando los programas pMLST v2.0 (Carattoli et.al., 2014) del Centro de Epidemiología Genómica (CGE) y la base de datos Plasmid MLST disponible en el sitio web PubMLST.org (Jolley et.al., 2018). Tanto en pMLST como en Plasmid MLST se evaluaron los perfiles de los grupos de incompatibilidad A/C, I1, HI1, HI2, F y N. En Plasmid MLST la búsqueda se realizó mediante la opción *query a sequence (single sequence)* y se indicó que la búsqueda fuera en todos los loci (*all loci*) con el fin de obtener solo *matches* exactos.

4.4.4.4 Búsqueda de plásmidos conjugativos. Para determinar si los plásmidos identificados eran de tipo conjugativo, se construyó una base de datos con las proteínas que conforman el sistema conjugativo en plásmidos tipo F de acuerdo con lo descrito en la literatura (Wagner et.al., 2013; Zatyka & Thomas, 1998). Las secuencias de estas proteínas fueron tomadas del plásmido pSLT de *S. enterica* ser. Typhimurium LT2 (número de acceso Genbank AE006471.2) y complementadas de la base de datos Uniprot teniendo en cuenta que pertenecieran a *S. enterica* ser. Typhimurium LT2.

En el caso específico del megaplásmido identificado se construyó una base de datos con las proteínas que conforman las regiones de transferencia, líder y de replicación de plásmidos IncI1 como lo son los megaplásmidos pESI. Las secuencias para esta base de datos fueron tomadas de las proteínas descritas para el megaplásmido pESI119944 de *Salmonella enterica* ser. Infantis (Aviv et.al., 2014; Cohen et al., 2020) y el plásmido R64 de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (Sampei et.al., 2010).

Finalmente, cada base de datos se comparó con las secuencias proteicas obtenidas en la anotación de los plásmidos y megaplásmido, mediante un alineamiento usando el programa blastp de BLAST+2.9.0 (Altschul,1990) con la opción *-evalue 1e-5* y se consideró como *hit* positivo aquellos alineamientos con porcentaje de identidad y fracción de alineamiento del *query* mayor a 90%.

5. Resultados

5.1 Selección de aislamientos de *Salmonella enterica*

Los aislamientos de este proyecto fueron seleccionados a partir del grupo de aislamientos de pollo que presentaron una CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) a colistina mayor de 2 mg/mL y en los cuales no se detectó por PCR punto final genes compatibles con el gen *mcr* (*mcr*-1 a *mcr*-5) debido a que los resultados obtenidos de la secuenciación de los amplicones fueron inconclusos. De allí el interés de caracterizar por WGS los aislamientos 25TBS y 33TXLD.

5.2 Control de calidad

En la Tabla 2 se presentan las estadísticas de los datos brutos obtenidos del proceso de secuenciación de los dos genomas de estudio.

Tabla 2

Estadísticas de los Datos Brutos del Genoma.

ID aislamiento	25TBS	33TXLD
Total bases leídas	2,899,587,164	2,799,072,806
Total lecturas	19,202,564	18,536,906
%GC	52.84	52.72
%AT	47.16	47.27
Q20 (%)	99.16	99.13
Q30 (%)	96.09	95.95
Cobertura estimada*/observada**	595x/433x	574x/464x

Nota: *Cobertura estimada calculada mediante la ecuación de Lander/Waterman (Lander & Waterman, 1988). **Mediana de la cobertura de los *contigs*, obtenida mediante *bedtools genomecov* (Quinlan & Hall, 2010). La mediana de la cobertura del genoma 33TXLD sin los *contigs* del megaplásmido fue de 521x. La mediana del megaplásmido fue 456x.

El control de calidad se realizó mediante el programa FastQC. Los resultados obtenidos en el parámetro de calidad de secuencia por base en los dos aislamientos de estudio muestran que todas las bases obtuvieron un *score* >30 (ver Apéndice A) indicando llamadas de muy buena calidad; en general nueve de los once módulos de análisis se encuentran totalmente normales y dos de los módulos presentan alarma; estos módulos corresponden al contenido GC y niveles de duplicación por secuencia. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos ítems (ver Apéndice B) no alteran significativamente la calidad de las lecturas y por tanto no fue necesario ningún tratamiento posterior para corrección de las mismas.

5.3 Ensamblaje

El ensamblaje se realizó mediante los programas SPAdes y Unicycler para seleccionar aquel que presentara mayor calidad. La selección del ensamblaje se basó en las métricas obtenidas en QUAST, utilizando como referencia los genomas listados en la Tabla 3. La Tabla 4 muestra las estadísticas obtenidas sin genoma de referencia. Los resultados obtenidos al comparar con los genomas de referencia se presentan en la Tabla 5 y Tabla 6.

Tabla 3*Genomas de referencia usados en QUAST*

ID ¹	Cepa ²	ST ³	Origen	Tecnología de secuenciación	Número de acceso
25TBS	<i>S. Newport</i> str. USDA-ARS-USMARC-1927	118	Carne molida, ganado, humano	PacBio	NZ_CP0072.16.2 ⁴
	<i>S. Newport</i> str. CVM N18486	45	Pavo	PacBio	NZ_CP009561.1 ⁴
	<i>S. Newport</i> str. SL254	45	Humano	3730xl DNA Analyzer	NC_011080.1 ⁴
	<i>S. Newport</i> str. VNSEC023	4166	Heces de pollo y cerdo	PacBio	CP039437.1 ⁴
	<i>S. Newport</i> str. BCW_2748	No conocido	Carne de pollo	Illumina	MYAQ000000000
	<i>S. Newport</i> str. FCC0034	2370	Queso	Illumina	AAPFWM010000001.1
33TXLD	<i>S. Infantis</i> str. FSIS1502169	32	Intestino de pollo	PacBio	NZ_CP016406.1 ⁴
	<i>S. Infantis</i> str. FARPER-219	32	Hígado y bazo de pollo	PacBio	CP038507.1 ⁴
	<i>S. Infantis</i> str 1326/28	32	Pollos de engorde	Illumina	NZ_LN649235.1 ⁴
	<i>S. Infantis</i> str. 119944	32	Humano (heces)	Illumina y Minion	CP047881.1 ⁴
	<i>S. Infantis</i> str. CVM	32	Alas de pollo	PacBio	CP052821.1 ⁴
	<i>S. Infantis</i> str. NC_SI017	32	Pollo de engorde	Illumina	AAEVJM000000000.1
	<i>S. Infantis</i> str. NC_SI690	32	Jaula de pollo	Illumina	AAQJVB000000000.1

¹Identificación aislamientos; ²Nomenclatura de la base de datos; ³Secuenciotipo; ⁴Genoma completo.

Tabla 4

Estadísticas QUAST (sin referencia) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para los aislamientos de estudio

Aislamiento	Métricas QUAST	SPAdes	Unicycler
25TBS	<i># contigs</i>	93	42
	Longitud total	4753644	4744243
	N50	431512	465198
	BUSCO completos (%) ¹	98.65	98.65
	BUSCO completos (%) ²	99.1	99.1
33TXLD	<i># contigs</i>	142	73
	Longitud total	5000136	4984013
	N50	194149	216649
	BUSCO completos (%) ¹	98.65	98.65
	BUSCO completos (%) ²	99.1	99.1

Nota: Se resaltan en negrilla los parámetros más importantes para la selección del ensamblaje final. ¹Usa el conjunto de datos *bacteria_odb9*.

²Porcentaje de genes BUSCO obtenido usando el programa de forma independiente, conjunto de datos *enterobacterales_odb10*.

Tabla 5

Estadísticas QUAST (con referencias) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para el aislamiento 25TBS

Referencia*	Métricas QUAST	SPAdes	Unicycler
<i>S. Newport</i> str. USDA-ARS, 4695514 pb, 1 fragmento, % GC 52.18, ST118	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	97.28 12	97.25 11
<i>S. Newport</i> str. FCC0034, 4651298 pb, 32 fragmentos, % GC 52.20, ST2370	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	98.52 18	98.53 16
<i>S. Newport</i> str. CVMN18486, 4755838 pb, 1 fragmento, % GC 52.25, ST45	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	94.95 32	94.96 32
<i>S. Newport</i> str. SL254, 4827641 pb, 1 fragmento, % GC 52.22, ST45	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	93.59 33	93.60 33
<i>S. Newport</i> str. VNSEC023, 468058 pb, 1 fragmento, % GC 52.17, ST4166	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	94.75 41	94.71 39
<i>S. Newport</i> str. BCW_2748, 4679325 pb, 872 fragmentos, % GC 52.13, ST no conocido	Fracción del genoma (%) # <i>misassemblies</i>	88.98 109	88.98 109

Nota: Se resaltan en negrilla los parámetros más importantes para la selección del ensamblaje final. *Nomenclatura de la base de datos.

Tabla 6*Estadísticas QUAST (con referencias) de los ensamblajes obtenidos por SPAdes y Unicycler para el aislamiento 33TXLD*

Referencia*	Métricas QUAST	SPAdes	Unicycler
<i>S. Infantis</i> str. FSIS1502169, 4727126 pb, 1 fragmento, % GC 52.27, ST32	Fracción del genoma (%)	98.72	98.67
	# <i>misassemblies</i>	0	0
<i>S. Infantis</i> str. CVMN17S1349, 4727144 pb, 1 fragmento, % GC 52.27, ST32	Fracción del genoma (%)	98.72	98.67
	# <i>misassemblies</i>	2	0
<i>S. Infantis</i> str FARPER-219, 4727696 pb, 1 fragmento, % GC 52.27, ST32	Fracción del genoma (%)	98.66	98.60
	# <i>misassemblies</i>	5	3
<i>S. Infantis</i> str. 1326/28, 4710675 pb, 1 fragmento, % GC 52.29, ST 32	Fracción del genoma (%)	97.14	97.09
	# <i>misassemblies</i>	4	4
<i>S. Infantis</i> 119944, 4725957 pb, 1 fragmento, % GC 52.30, ST32	Fracción del genoma (%)	98.16	98.1
	# <i>misassemblies</i>	5	3
<i>S. Infantis</i> str. NC_SI017, 4754853 pb, 62 fragmentos,	Fracción del genoma (%)	96.84	98.85
	# <i>misassemblies</i>	10	9
<i>S. Infantis</i> str. NC_SI690, 4658097 pb, 47 fragmentos, % GC 52.30, ST32	Fracción del genoma (%)	98.36	98.36
	# <i>misassemblies</i>	4	2

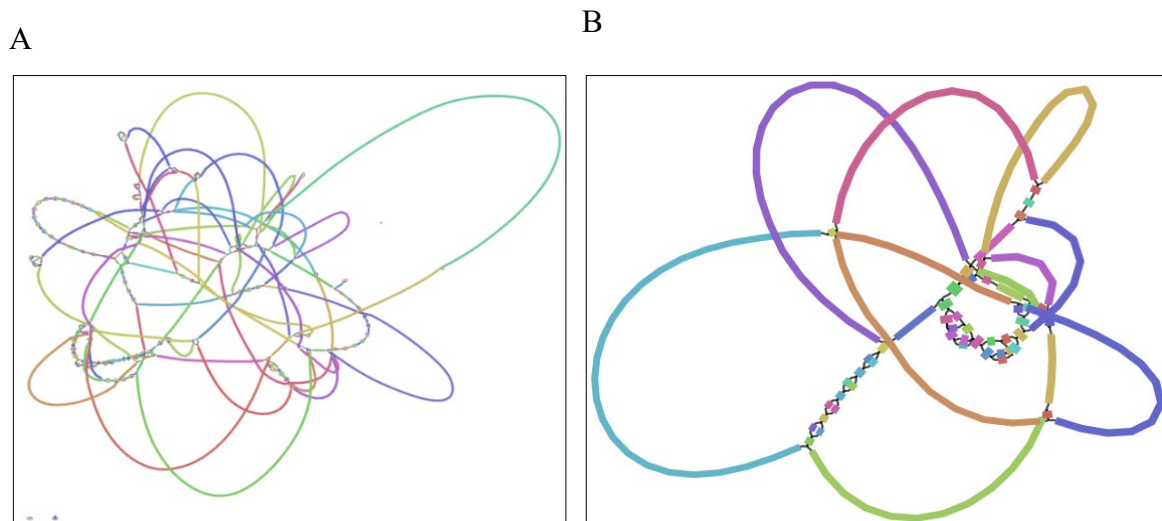
Nota: Se resaltan en negrilla los parámetros más importantes para la selección del ensamblaje final. *Nomenclatura de la base de datos.

Como se observa en la Tabla 4, en el ensamblaje obtenido con Unicycler el número de *contigs* fue menor en comparación con el obtenido usando SPAdes, lo que genera una gráfica de ensamblaje simplificada en comparación a la obtenida con SPAdes (Figura 2 y Figura 3); así mismo, con el ensamblaje de Unicycler se obtuvieron valores superiores de N50 y la longitud del genoma fue más cercana al genoma de comparación en tres de las seis referencias usadas para 25TBS y con todas las referencias utilizadas para 33TXLD; finalmente, en cuanto a los *misassemblies* el número fue menor en Unicycler con todas las referencias de alineamiento, excepto para dos referencias en 25TBS y dos en 33TXLD, en los cuales el número de *misassemblies* fue igual para los dos ensambladores (Tabla 5 y Tabla 6).

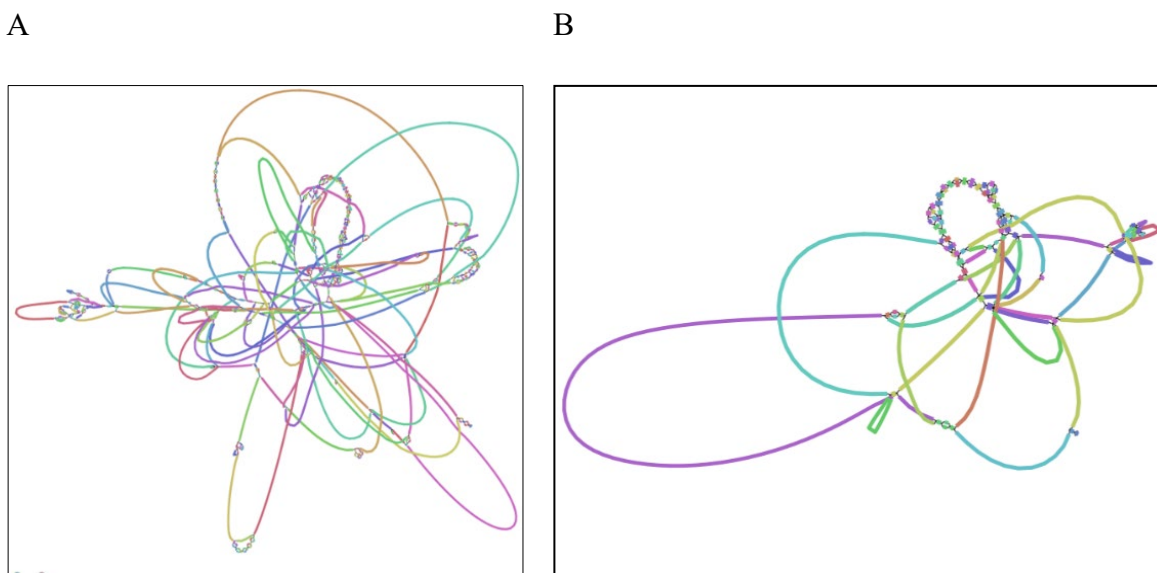
Por las razones anteriormente mencionadas se seleccionó el ensamblaje de Unicycler para continuar los análisis posteriores. Cabe destacar que los resultados descritos anteriormente se presentan en el análisis de los dos genomas de estudio y que respecto al porcentaje de fracción de genoma y el porcentaje de genes BUSCO, los resultados obtenidos en los dos ensamblajes fueron muy similares, lo que muestra la misma eficiencia en los dos ensambladores frente a estos parámetros.

Figura 2

Grafos del genoma ensamblado del aislamiento 25TBS



Nota: La figura A muestra el grafo del ensamblaje obtenido con SPAdes. La figura B muestra el grafo del ensamblaje obtenido con Unicycler. Grafos visualizados con Bandage a partir de los archivos GFA (del inglés, *Graphical Fragment Assembly*) generados por los ensambladores (Wick et al., 2015).

Figura 3. Grafos del genoma ensamblado del aislamiento 33TXLD

Nota: La figura A muestra el grafo del ensamblaje obtenido con SPAdes. La figura B muestra el grafo del ensamblaje obtenido con Unicycler. Grafos visualizados con Bandage a partir de los archivos GFA generados por los ensambladores (Wick et al., 2015).

El reporte dado por el programa QUAST clasifica los *misassemblies* en reubicaciones, inversiones y traslocaciones. En el análisis realizado en los aislamientos de estudio este programa mostró que los *misassemblies* encontrados se debían a reubicaciones e inversiones, los cuales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7*Reporte de misassemblies en QUAST para los aislamientos de estudio*

Aislamiento	Genoma referencia* (no fragmentado)	Total <i>misassemblies</i>	Tipo <i>misassemblies</i>	# <i>Contigs</i>	<i>Contigs</i>
25TBS	<i>S. Newport</i> str. USDA-ARS-USMARC-1927	11	11 reubicaciones	5	2, 3, 6, 7, 9
	<i>S. Newport</i> str. CVM N18486	32	2 inversiones, 30 reubicaciones	11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,12
	<i>S. Newport</i> str. SL254	33	2 inversiones, 31 reubicaciones	11	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
	<i>S. Newport</i> str. VNSEC023	39	39 reubicaciones	12	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,14
33TXLD	<i>S. Infantis</i> str. FSIS1502169	0	-	-	-
	<i>S. Infantis</i> str. FARPER-219	3	2 inversiones, 1 reubicación	2	1, 2
	<i>S. Infantis</i> str. 1326/28	4	4 reubicaciones	4	1,5,7,13
	<i>S. Infantis</i> str. 119944	3	2 inversiones, 1 reubicación	2	2,3,12
	<i>S. Infantis</i> str. CVM N17S1349	0	-	-	-

Nota: *Nomenclatura de la base de datos.

5.4 Tipificación molecular

De acuerdo con el análisis comparativo de genomas los dos aislamientos fueron clasificados como *Salmonella enterica* subespecie enterica con un porcentaje de similitud del gen del ARN ribosomal 16S (rRNA) de 99.86% para 25TBS y 99.32% para 33TXLD. El aislamiento 25TBS fue identificado como serovariedad Newport (ANI 99.92%) secuenciotipo 2370, mientras que 33TXLD fue clasificado como serovariedad Infantis (ANI 99.91%) secuenciotipo 32. La serovariedad identificada para cada aislamiento fue coincidente en los dos métodos de serotipificación utilizados (análisis comparativo de genomas y determinación directa). Los resultados de la determinación directa se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8

Resultados serotipificación usando SeqSero2 y SISTR

Parámetros	SeqSero2		SISTR	
	25TBS	33TXLD	25TBS	33TXLD
Antígeno O	8	7	6, 8, 20	6, 7, 14
Antígeno H1	e, h	R	e, h	R
Antígeno H2	1, 2	1,5	1, 2	1,5
Perfil antigénico	8:e,h:1,2	7:r:1,5	-	-
Serogrupo	-	-	C2-C3	C1
Serovariedad	Newport	Infantis	Newport	Infantis

Nota: Los números y letras corresponden al tipo de antígeno somático y flagelar del esquema desarrollado por Kauffmann-White que es el método tradicional usado para la designación de serovariedades de *Salmonella*.

5.5. Identificación de determinantes de resistencia antimicrobiana

Los genes de resistencia a antibióticos encontrados por los programas RGI y ABRicate (MEGARES y CARD) para el aislamiento 25TBS se encuentran en la Tabla 9 y Tabla 10 respectivamente. El programa ResFinder y la base de datos ResFinder del programa ABRicate reportaron el gen *aac(6')-Iaa*; por su parte, PointFinder reportó dos sustituciones puntuales no sinónimas en *parC* (T57S y A620T) para este aislamiento.

Tabla 9

Determinantes de resistencia reportados por RGI para el genoma 25TBS

Modelo	Determinante de resistencia*	% Identidad	Mecanismo de resistencia
Perfect	<i>golS</i>	100	Expulsión de antibiótico/betalactámicos, fenicoles
	<i>mdsC</i>	100	
	<i>bacA</i>	97.07	Alteración de target/antibióticos peptídicos
Strict	<i>aac(6')-Iy</i>	97.93	Inactivación de antibiótico/aminoglucósidos
	<i>ampH</i>	91.17	Inactivación de antibiótico/ cefalosporinas y penicilinas
	<i>acrD</i>	94.21	Expulsión de antibiótico/aminoglucósidos
	<i>kdpE</i>	91.52	
	<i>marA</i>	95.24	Expulsión y disminución permeabilidad antibiótico/betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, fenicoles, rifamicina, triclosan
	<i>sdiA</i>	99.58	
	<i>acrA</i>	91.69	
	<i>acrB</i>	94.57	

<i>mdsA</i>	97.79	Expulsión de antibiótico/betalactámicos y fenicoles
<i>mdsB</i>	99.72	
<i>msbA</i>	96.39	Expulsión de antibiótico/nitroimidazoles
<i>crp</i>	99.05	Expulsión de antibiótico/macrólidos, fluoroquinolonas y penicilinas
<i>mdtK</i>	99.37	Expulsión de antibiótico/ fluoroquinolonas
<i>mdtB</i>	92.02	Expulsión de antibiótico/aminocoumarina
<i>mdtC</i>	91.41	
<i>baeR</i>	96.25	Expulsión de antibiótico/aminoglucósidos y aminocoumarina
<i>cpxA</i>	96.94	
<i>emrR</i>	93.14	Expulsión de antibiótico/fluoroquinolas
<i>emrB</i>	95.62	
<i>tufA</i> (R234F)	99.49	Alteración de target/pulvomycin
<i>glpT</i> (E350Q)	95.68	Alteración del sitio blanco/fosfomicina
<i>uhpT</i> (E448K)	96.9	

Nota: *Nomenclatura usada en la base de dato.

Tabla 10

Determinantes de resistencia reportados por ABRicate para el aislamiento 25TBS

MEGARes		CARD		
Gen*	% Identidad	Gen*	% Identidad	Antibiótico
AAC (6')	99.09	<i>aac (6')-Iy</i>	99.09	Aminoglucósido
-	-	<i>golS</i>	99.57	Betalactámicos, fenicol

GESA	98.53	<i>mdsA</i>	98.53	Betalactámicos, fenicol
GESB	99.27	<i>mdsB</i>	99.27	
GESC	99.93	<i>mdsC</i>	99.93	
SDIA	98.89	<i>sdiA</i>	100	Betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, fenicoles, rifamicina, triclosan
MDTK	98.67	<i>mdtK</i>	100	Fluoroquinolona
MDTA	99.19	-	-	-
MDTB	98.78	-	-	-
MDTC	98.77	-	-	-
BAES	99.50	-	-	-
BAER	98.75	-	-	-
ACRD	99.04	-	-	-
PMRG	99.83	-	-	-

Nota: *Nomenclatura usada en la base de datos.

En resumen, el genoma del aislamiento 25TBS presenta genes y sustituciones no sinónimas que pueden conferir resistencia a múltiples clases de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas, beta-lactámicos de bajo espectro, fosfomicinas, elfamicinas y polimixinas, así como genes codificantes para bombas de eflujo multifármaco; lo que refleja el potencial de MDR² de este aislamiento.

Los genes de resistencia a antibióticos reportados por los programas ResFinder, *RGI* y ABRicate para el aislamiento 33TXLD se encuentran en la Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13 respectivamente. El programa PointFinder reportó una sustitución puntual en *gyrA* (D87Y) y una en *parC* (T57S) para este aislamiento.

Tabla 11

Genes de resistencia reportados por ResFinder para el aislamiento 33TXLD

Gen*	% Identidad	Antibiótico
<i>aph(3')-Ia</i>	100	Aminoglucósidos
<i>aadA1</i>	99.74	
<i>aph(4)-Ia</i>	100	
<i>aac(3)-IV</i>	100	
<i>aac(6')-Iaa</i>	97.48	
<i>sulI</i>	100	Antagonista vía del folato
<i>dfrA14</i>	100	
<i>tet(A)</i>	100	Tetraciclina
<i>floR</i>	98.18	Fenicol
<i>fosA3</i>	100	Fosfomicina

² MDR: no susceptibilidad adquirida a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012).

<i>bla</i> CTX-M-65	100	Betalactámicos
---------------------	-----	----------------

Nota: *Nomenclatura usada en la base de dato

Tabla 12

Determinantes de resistencia reportados por RGI para el aislamiento 33TXLD

Modelo	Determinante de resistencia	% Identidad	Mecanismo resistencia
Perfect	<i>golS</i>	100	Expulsión de antibiótico/betalactámicos, fenicoles
	<i>aph(4)-Ia</i>	100	Inactivación de antibiótico/aminoglucósidos
	<i>aph(3')-Ia</i>	100	
	<i>sulI</i>	100	Reemplazo de sitio blanco/sulfonamida
	<i>bla</i> CTX-M-65	100	β -lactamasa/cefalosporina
	<i>fosA3</i>	100	Inactivación de antibiótico/fosfomicina
Strict	<i>gyrA</i> (D87Y)	99.89	Alteración de sitio blanco/quinolona
	<i>aac(6')-Iy</i>	97.93	Inactivación de antibiótico/aminoglucósidos
	<i>aac(3)-IV</i>	99.61	
	<i>ant(3'')-IIa</i>	99.61	
	<i>ampH</i>	91.43	Inactivación de antibiótico/ cefalosporinas y penicilinas
	<i>dfrA14</i>	99.36	Reemplazo de sitio blanco/diaminopirimidina
	<i>floR</i>	99.26	Expulsión de antibiótico/fenicol
	<i>tet(A)</i>	98.48	Expulsión de antibiótico/tetraciclina
	<i>bacA</i>	96.7	Alteración de sitio blanco/ antibióticos peptídicos

<i>marA</i>	95.24	Expulsión y disminución permeabilidad antibiótico/betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas fenicoles, rifamicina, triclosán
<i>sdiA</i>	99.58	
<i>acrB</i>	94.57	
<i>acrA</i>	91.69	
<i>acrD</i>	94.21	Expulsión de antibiótico/aminoglucósidos
<i>kdpE</i>	92.41	
<i>mdsA</i>	98.28	Expulsión de antibiótico/betalactámicos y fenicoles
<i>mdsB</i>	99.91	
<i>mdsC</i>	99.18	
<i>msbA</i>	96.39	Expulsión de antibiótico/nitroimidazoles
<i>crp</i>	99.05	Expulsión de antibiótico/macrólidos, fluoroquinolonas y penicilinas
<i>mdtK</i>	99.58	Expulsión de antibiótico/ fluoroquinolonas
<i>mdtC</i>	91.51	Expulsión de antibiótico/aminocoumarina
<i>mdtB</i>	91.73	
<i>baeR</i>	96.67	Expulsión de antibiótico/aminoglucósidos y aminocoumarina
<i>cpxA</i>	96.94	
<i>emrB</i>	95.82	Expulsión de antibiótico/fluoroquinolas
<i>emrR</i>	93.14	
<i>tufA</i> (R234F)	99.65	Alteración de target/pulvomicina
<i>glpT</i> (E350Q)	95.68	Alteración del sitio blanco/fosfomicina
<i>uhpT</i> (E448K)	96.9	
<i>marR</i>	92.36	

<i>soxS</i>	95.33	Alteración de sitio blanco, expulsión de antibiótico, disminución permeabilidad/ betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas fenicoles,
<i>soxR</i>	96.05	

Tabla 13

Determinantes de resistencia reportados por ABRicate para el aislamiento 33TXLD

MEGARes		ResFinder		CARD		
Gen*	% ID	Gen*	% ID	Gen*	% ID	Antibiótico
AAC (6')	97.94	<i>aac(6')-Iaa_1</i>	97.49	<i>aac(6')-Iy</i>	99.09	Aminoglucósido
ANT (3')	99.49	<i>ant(3'')-Ia_1</i>	99.49	-	-	Estreptomicina
AAC3	99.87	<i>aac(3)-IVa_1</i>	99.87	<i>aac(3)-IV</i>	100	Gentamicina, Tobramicina
APH4	100	<i>aph(4)-Ia_1</i>	100	<i>aph(4)-Ia</i>	100	Higromicina
APH (3')	100	<i>aph(3')-Ia_7</i>	100	<i>aph(3')-Ia</i>	100	Kanamicina
SULI	100	<i>sulI_5</i>	99.89	<i>sulI</i>	100	Sulfametoxazol
TETA	100	<i>tet(A)_6</i>	100	<i>tet(A)</i>	100	Doxiciclina, tetraciclina
FLOR	100	<i>floR_2</i>	98.19	<i>floR</i>	99.75	Cloramfenicol, florfenicol
FOSA	100	<i>fosA3_1</i>	100	<i>fosA3</i>	100	Fosfomicina
DFRA	100	<i>dfrA14_5</i>	99.79	<i>dfrA14</i>	100	Trimetoprim
CTX	100	<i>blaCTX-M-65_1</i>	100	<i>CTX-M-65</i>	100	Betalactámicos
ACRD	99.29	-	-	-	-	Aminoglucósidos
PMRG	99.34	-	-	-	-	Polimixina
-	-	-	-	<i>ant(3'')-IIa</i>	99.49	Aminoglucósido
-	-	-	-	<i>golS</i>	98.71	Betalactámicos, fenicol

GESA	98.86	-	-	<i>mdsA</i>	98.86	
GESB	99.62	-	-	<i>mdsB</i>	99.62	
GESC	98.55	-	-	<i>mdsC</i>	98.55	
SDIA	99.03	-	-	<i>sdiA</i>	99.03	Betalactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, fenicoles, rifamicina, triclosan
MDTA	99.03	-	-	-	-	-
MDTB	98.72	-	-	-	-	-
MDTC	98.38	-	-	-	-	-
BAES	98.43	-	-	-	-	-
BAER	99.03	-	-	-	-	-

Nota: *Nomenclatura usada en la base de datos.

En comparación con el aislamiento 25TBS, el aislamiento 33TXLD presentó determinantes de resistencia a diez grupos de antibióticos que incluyen aminoglucósidos, betalactámicos, diaminopirimidinas, fenicoles, fosfomicinas, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, elfamicinas y polimixinas, junto con genes de bombas de eflujo multifármaco. Lo anterior, evidencia el potencial de MDR de este aislamiento.

Para los dos aislamientos la búsqueda en la base de datos MEGARES mostró la presencia del gen *pmrG* el cual modifica el *core* del LPS disminuyendo la carga negativa general de la superficie celular (Nishino, 2006) y podría estar asociado con la resistencia a colistina. En ninguno de los aislamientos fueron reportados genes de tipo *mcr*. La variante *mcr*-10.1 descrita por Wang et al., 2020 fue evaluada mediante su incorporación en una base de datos creada en ABRicate, denominada *colistindatabase*, sin embargo, esta tampoco fue encontrada en los genomas de estudios.

En la anotación del genoma del aislamiento 25TBS se obtuvo un total de 4451 CDS, 78 tRNAs, un tmRNA y seis rRNAs. Para el aislamiento 33TXLD se predijeron 4664 CDS, 79 tRNAs, un tmRNA y cuatro rRNAs. Las proteínas anotadas por Prokka que están implicadas en la modificación del LPS y que podrían conducir a la resistencia a colistina por su sobreexpresión se observan en la Tabla 14. Este proyecto de *Whole Genome Shotgun* ha sido depositado en DDBJ/ENA/GenBank bajo el número de acceso JAMRYV000000000 (para 33TXLD) y JAMRYW000000000 (para 25TBS), sin embargo, aún no se encuentra liberado.

Tabla 14

Gen y correspondiente proteína anotada asociadas con la resistencia a colistina para los dos aislamientos de estudio

Gen	Producto
<i>phoP</i>	Proteína reguladora transcripcional
<i>phoQ</i>	Sensor de virulencia histidina quinasa
<i>pmrA (basR)</i>	Proteína reguladora transcripcional
<i>pmrB (basS)</i>	Sensor proteína quinasa
<i>eptA (pmrC)</i>	Transferasa de fosfoetanolamina
<i>eptC (cptA)</i>	Transferasa de fosfoetanolamina
<i>eptB</i>	Transferasa de fosfoetanolamina Kdo-Lípido A
<i>pmrD</i>	Proteína de transducción de señal
<i>arnA (pmrI)</i>	Proteína de resistencia a polimixina bifuncional

<i>arnB</i> (<i>pmrH</i>)	UDP-4-amino-4-desoxi-L-arabinosa-oxoglutarato
<i>arnC</i> (<i>pmrF</i>)	Undecaprenil-fosfato 4-deoxi-4-formamido-L-arabinosa transferasa
<i>arnD</i> (<i>pmrJ</i>)	4-desoxi-4-formamido-L-arabinosa-fosfoundecaprenol deformilasa putativa
<i>arnT</i> (<i>pmrK</i>)	Fosfato de undecaprenilo alfa-4-amino-4-desoxi-L- arabinosa arabinosil transferasa
<i>arnE</i> (<i>pmrL</i>)	Subunidad 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa- fosfoundecaprenol flipasa putativa
<i>pmrE</i> (<i>ugd</i>)	UDP-glucosa 6-deshidrogenasa
<i>pmrG</i>	Fosfatasa de la heptosa II del <i>core</i> del LPS
<i>pagL</i>	3-O deacilasa de lípido A
<i>lpxO</i>	Dioxigenasa (Aspartil/asparaginilo beta-hidroxilasa)
<i>pmrR</i>	Modulador de la actividad de LpxT

Nota: entre paréntesis se encuentran otros nombres con los que se conoce cada gen.

5.5.1 Determinantes de resistencia a colistina de codificación cromosomal

Adicionalmente, en los dos genomas de estudio se realizó una búsqueda detallada de sustituciones no sinónimas, asociadas con la resistencia a colistina, en las proteínas PmrA, PmrB, PhoP, PhoQ, PmrD y PmrC. que han sido reportadas en la literatura. Es importante resaltar que entre las dos cepas de estudio solo se presentaron diferencias en la secuencia de la proteína PmrC, las demás proteínas mencionadas fueron 100% idénticas.

Aunque no se encontró ninguna de las sustituciones descritas por Sun et al., 2009 para las proteínas PmrA, PmrB, PhoP y PhoQ utilizando como cepa de referencia *Salmonella enterica* ser. Typhimurium LT2, se encontraron las sustituciones descritas en PmrA (S89T, R211G), PmrB (T18M, S76G, V86I, T114A), PhoP (S131P) y PhoQ (T68A) reportadas por Wang et al., 2018 en

la cepa *Salmonella enterica* ser. Typhimurium WW012, resistente a colistina, tomando como cepa de referencia *Salmonella enterica* ser. Typhi CT18.

En la Figura 4 y Figura 5 se observa el alineamiento de las proteínas PmrA, PmrB, PhoP y PhoQ con las secuencias de referencia y la secuencia de la cepa *Salmonella enterica* ser. Typhimurium WW012.

Figura 4

Alineamientos de las proteínas PmrA y PmrB de los aislamientos de estudio

A

PmrA (BasR)_25TBS	1	MKILIVEDDTLLQGLILAAQTEGYACDGVSTARAAEHSLESGHYSLMVLDLGLPDEDGL	60
PmrA (BasR)_33TXLD	1	MKILIVEDDTLLQGLILAAQTEGYACDGVSTARAAEHSLESGHYSLMVLDLGLPDEDGL	60
PmrA_S.Typhimur..	1	MKILIVEDDTLLQGLILAAQTEGYACDGVSTARAAEHSLESGHYSLMVLDLGLPDEDGL	60
PmrA_S.TyphiCT18	1	MKILIVEDDTLLQGLILAAQTEGYACDGVSTARAAEHSLESGHYSLMVLDLGLPDEDGL	60
PmrA_WW012	1	MKILIVEDDTLLQGLILAAQTEGYACDGVSTARAAEHSLESGHYSLMVLDLGLPDEDGL	60

PmrA (BasR)_25TBS	61	HFLTRIRQKKYTLFVLILTARDTLNDRITGLDVGADDYLVKPFALAEELHARIRALLRRHN	120
PmrA (BasR)_33TXLD	61	HFLTRIRQKKYTLFVLILTARDTLNDRITGLDVGADDYLVKPFALAEELHARIRALLRRHN	120
PmrA_S.Typhimur..	61	HFLTRIRQKKYTLFVLILTARDTLNDRITGLDVGADDYLVKPFALAEELHARIRALLRRHN	120
PmrA_S.TyphiCT18	61	HFLTRIRQKKYTLFVLILTARDTLNDRITGLDVGADDYLVKPFALAEELHARIRALLRRHN	120
PmrA_WW012	61	HFLTRIRQKKYTLFVLILTARDTLNDRITGLDVGADDYLVKPFALAEELHARIRALLRRHN	120

PmrA (BasR)_25TBS	121	NQGESELTVGNTLTNIGRHQAWRDGQELTLPKEVALLSRMLKAGSPVHREILYNDIYN	180
PmrA (BasR)_33TXLD	121	NQGESELTVGNTLTNIGRHQAWRDGQELTLPKEVALLSRMLKAGSPVHREILYNDIYN	180
PmrA_S.Typhimur..	121	NQGESELTVGNTLTNIGRHQAWRDGQELTLPKEVALLSRMLKAGSPVHREILYNDIYN	180
PmrA_S.TyphiCT18	121	NQGESELTVGNTLTNIGRHQAWRDGQELTLPKEVALLSRMLKAGSPVHREILYNDIYN	180
PmrA_WW012	121	NQGESELTVGNTLTNIGRHQAWRDGQELTLPKEVALLSRMLKAGSPVHREILYNDIYN	180

PmrA (BasR)_25TBS	181	WDNEPSTNTLEVHIHNLDRKVGKSRIRTVVGFGYMLVATEES	222
PmrA (BasR)_33TXLD	181	WDNEPSTNTLEVHIHNLDRKVGKSRIRTVVGFGYMLVATEES	222
PmrA_S.Typhimur..	181	WDNEPSTNTLEVHIHNLDRKVGKSRIRTVVGFGYMLVATEES	222
PmrA_S.TyphiCT18	181	WDNEPSTNTLEVHIHNLDRKVGKSRIRTVVGFGYMLVATEES	222
PmrA_WW012	181	WDNEPSTNTLEVHIHNLDRKVGKSRIRTVVGFGYMLVATEES	222

B

PmrB (BasS)_25TBS	1	MSLMRFQRRAMTLRQRMITIGLILLVFQLISTFWLWHESTEQIQLFQCALDRNRRNDRH	60
PmrB (BasS)_33TXLD	1	MSLMRFQRRAMTLRQRMITIGLILLVFQLISTFWLWHESTEQIQLFQCALDRNRRNDRH	60
PmrB_S.Typhimur..	1	---MRFQRRAMTLRQRMITIGLILLVFQLISTFWLWHESTEQIQLFQCALDRNRRNDRH	57
PmrB_S.TyphiCT18	1	MSLMRFQRRAMTLRQRMITIGLILLVFQLISTFWLWHESTEQIQLFQCALDRNRRNDRH	60
PmrB_WW012	1	---MRFQRRAMTLRQRMITIGLILLVFQLISTFWLWHESTEQIQLFQCALDRNRRNDRH	57

PmrB (BasS)_25TBS	61	IMHEIREAVASLIVGFMVSLTLITCYQAVRIRTRPLAEQLKELEARTADNIAIAIHS	120
PmrB (BasS)_33TXLD	61	IMHEIREAVASLIVGFMVSLTLITCYQAVRIRTRPLAEQLKELEARTADNIAIAIHS	120
PmrB_S.Typhimur..	58	IMHEIREAVASLIVGFMVSLTLITCYQAVRIRTRPLAEQLKELEARTADNIAIAIHS	117
PmrB_S.TyphiCT18	61	IMHEIREAVASLIVGFMVSLTLITCYQAVRIRTRPLAEQLKELEARTADNIAIAIHS	120
PmrB_WW012	58	IMHEIREAVASLIVGFMVSLTLITCYQAVRIRTRPLAEQLKELEARTADNIAIAIHS	117

PmrB (BasS)_25TBS	121	STLEIESVVSAINQLVTRLTTTLDNERLFTADVAHELRTPLSGVRLHLELLSKTHNVDDVA	180
PmrB (BasS)_33TXLD	121	STLEIESVVSAINQLVTRLTTTLDNERLFTADVAHELRTPLSGVRLHLELLSKTHNVDDVA	180
PmrB_S.Typhimur..	118	STLEIESVVSAINQLVTRLTTTLDNERLFTADVAHELRTPLSGVRLHLELLSKTHNVDDVA	177
PmrB_S.TyphiCT18	121	STLEIESVVSAINQLVTRLTTTLDNERLFTADVAHELRTPLSGVRLHLELLSKTHNVDDVA	180
PmrB_WW012	118	STLEIESVVSAINQLVTRLTTTLDNERLFTADVAHELRTPLSGVRLHLELLSKTHNVDDVA	177

PmrB (BasS)_25TBS	181	FLIARLDQMMDSVSQQQLQARVGQSFSSGNYQEVKLLLEDVILPSYDELNTMLETRQQTLL	240
PmrB (BasS)_33TXLD	181	FLIARLDQMMDSVSQQQLQARVGQSFSSGNYQEVKLLLEDVILPSYDELNTMLETRQQTLL	240
PmrB_S.Typhimur..	178	FLIARLDQMMDSVSQQQLQARVGQSFSSGNYQEVKLLLEDVILPSYDELNTMLETRQQTLL	237
PmrB_S.TyphiCT18	181	FLIARLDQMMDSVSQQQLQARVGQSFSSGNYQEVKLLLEDVILPSYDELNTMLETRQQTLL	240
PmrB_WW012	178	FLIARLDQMMDSVSQQQLQARVGQSFSSGNYQEVKLLLEDVILPSYDELNTMLETRQQTLL	237

PmrB (BasS)_25TBS	241	LPESAADVVRGDATLLRMLLRNLVENAHRYSPGTHITIHISADPDAIMAVEDEGGPID	300
PmrB (BasS)_33TXLD	241	LPESAADVVRGDATLLRMLLRNLVENAHRYSPGTHITIHISADPDAIMAVEDEGGPID	300
PmrB_S.Typhimur..	238	LPESAADVVRGDATLLRMLLRNLVENAHRYSPGTHITIHISADPDAIMAVEDEGGPID	297
PmrB_S.TyphiCT18	241	LPESAADVVRGDATLLRMLLRNLVENAHRYSPGTHITIHISADPDAIMAVEDEGGPID	300
PmrB_WW012	238	LPESAADVVRGDATLLRMLLRNLVENAHRYSPGTHITIHISADPDAIMAVEDEGGPID	297

PmrB (BasS)_25TBS	301	ESKCGKLSAFAVRMDSRYGGIGLGLSIVSRITQLHQGQFFLQNRTERTGTRAWVLLKKA	359
PmrB (BasS)_33TXLD	301	ESKCGKLSAFAVRMDSRYGGIGLGLSIVSRITQLHQGQFFLQNRTERTGTRAWVLLKKA	359
PmrB_S.Typhimur..	298	ESKCGKLSAFAVRMDSRYGGIGLGLSIVSRITQLHQGQFFLQNRTERTGTRAWVLLKKA	356
PmrB_S.TyphiCT18	301	ESKCGKLSAFAVRMDSRYGGIGLGLSIVSRITQLHQGQFFLQNRTERTGTRAWVLLKKA	359
PmrB_WW012	298	ESKCGKLSAFAVRMDSRYGGIGLGLSIVSRITQLHQGQFFLQNRTERTGTRAWVLLKKA	356

Nota: Los alineamientos se realizaron con Clustal Omega disponible en UniProt. A: secuencias de PmrA; B: secuencias de PmrB. Las posiciones idénticas se colorean en color gris oscuro y los cambios respecto a las secuencias de referencia se señalan en los recuadros rojos. *S. Typhimur*: *S. Typhimurium* LT2. WW012: *S. Typhimurium* WW012.

Figura 5

Alineamientos de las proteínas PhoP y PhoQ de los aislamientos de estudio

A

PhoP_25TBS	1	MMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQDSGHQVDAEDAREADYYLNEHLPDIAIVDLGLPDEDG	60
PhoP_33TXLD	1	MMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQDSGHQVDAEDAREADYYLNEHLPDIAIVDLGLPDEDG	60
PhoP_S.Typhimur..	1	MMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQDSGHQVDAEDAREADYYLNEHLPDIAIVDLGLPDEDG	60
PhoP_S.TyphiCT18	1	MMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQDSGHQVDAEDAREADYYLNEHLPDIAIVDLGLPDEDG	60
PhoP_WW012	1	MMRVLVVEDNALLRHHLKVQLQDSGHQVDAEDAREADYYLNEHLPDIAIVDLGLPDEDG	59

PhoP_25TBS	61	LSLIRRWSSSDVSLFVLVLTAREGWQDKVEVLSSGADDYVTKPFHIEEVMARMAQALMRN	120
PhoP_33TXLD	61	LSLIRRWSSSDVSLFVLVLTAREGWQDKVEVLSSGADDYVTKPFHIEEVMARMAQALMRN	120
PhoP_S.Typhimur..	61	LSLIRRWSSSDVSLFVLVLTAREGWQDKVEVLSSGADDYVTKPFHIEEVMARMAQALMRN	120
PhoP_S.TyphiCT18	61	LSLIRRWSSSDVSLFVLVLTAREGWQDKVEVLSSGADDYVTKPFHIEEVMARMAQALMRN	120
PhoP_WW012	60	LSLIRRWSSSDVSLFVLVLTAREGWQDKVEVLSSGADDYVTKPFHIEEVMARMAQALMRN	119

PhoP_25TBS	121	SGLASQVINIFPFQVDLSRRELNVNEEVIKLTAFEYTIMETLIRNNGKVSKDSIMLQLY	180
PhoP_33TXLD	121	SGLASQVINIFPFQVDLSRRELNVNEEVIKLTAFEYTIMETLIRNNGKVSKDSIMLQLY	180
PhoP_S.Typhimur..	121	SGLASQVINIFPFQVDLSRRELNVNEEVIKLTAFEYTIMETLIRNNGKVSKDSIMLQLY	180
PhoP_S.TyphiCT18	121	SGLASQVINIFPFQVDLSRRELNVNEEVIKLTAFEYTIMETLIRNNGKVSKDSIMLQLY	180
PhoP_WW012	120	SGLASQVINIFPFQVDLSRRELNVNEEVIKLTAFEYTIMETLIRNNGKVSKDSIMLQLY	179

PhoP_25TBS	181	PDDELRESHTIDVLMGRLRKIKQAQYPHDVITTVRGQGYLFELR	224
PhoP_33TXLD	181	PDDELRESHTIDVLMGRLRKIKQAQYPHDVITTVRGQGYLFELR	224
PhoP_S.Typhimur..	181	PDDELRESHTIDVLMGRLRKIKQAQYPHDVITTVRGQGYLFELR	224
PhoP_S.TyphiCT18	181	PDDELRESHTIDVLMGRLRKIKQAQYPHDVITTVRGQGYLFELR	224
PhoP_WW012	180	PDDELRESHTIDVLMGRLRKIKQAQYPHDVITTVRGQGYLFELR	223

B

PhoQ_25TBS	1	MMKFAHFPLPLSLRVFLLATAGVVLVLSLAYGIVALUGYSVSFDKTFPALLRGEENLFY	60
PhoQ_33TXLD	1	MMKFAHFPLPLSLRVFLLATAGVVLVLSLAYGIVALUGYSVSFDKTFPALLRGEENLFY	60
PhoQ_S.Typhimur..	1	MMKFAHFPLPLSLRVFLLATAGVVLVLSLAYGIVALUGYSVSFDKTFPALLRGEENLFY	60
PhoQ_S.TyphiCT18	1	MMKFAHFPLPLSLRVFLLATAGVVLVLSLAYGIVALUGYSVSFDKTFPALLRGEENLFY	60
PhoQ_WW012	1	MMKFAHFPLPLSLRVFLLATAGVVLVLSLAYGIVALUGYSVSFDKTFPALLRGEENLFY	60

PhoQ_25TBS	61	TLAKWENNKISVELPENLQCSPTMTLYDETGKLLWTQRNIFWLKSTQPEWLKNGHF	120
PhoQ_33TXLD	61	TLAKWENNKISVELPENLQCSPTMTLYDETGKLLWTQRNIFWLKSTQPEWLKNGHF	120
PhoQ_S.Typhimur..	61	TLAKWENNKISVELPENLQCSPTMTLYDETGKLLWTQRNIFWLKSTQPEWLKNGHF	120
PhoQ_S.TyphiCT18	61	TLAKWENNKISVELPENLQCSPTMTLYDETGKLLWTQRNIFWLKSTQPEWLKNGHF	120
PhoQ_WW012	61	TLAKWENNKISVELPENLQCSPTMTLYDETGKLLWTQRNIFWLKSTQPEWLKNGHF	120

PhoQ_25TBS	121	EIETNVDATSTLLSEDSHAQEKLEKVEUREDDDDAEMTHSVAUNIVPAALIMPQITIVVVDI	180
PhoQ_33TXLD	121	EIETNVDATSTLLSEDSHAQEKLEKVEUREDDDDAEMTHSVAUNIVPAALIMPQITIVVVDI	180
PhoQ_S.Typhimur..	121	EIETNVDATSTLLSEDSHAQEKLEKVEUREDDDDAEMTHSVAUNIVPAALIMPQITIVVVDI	180
PhoQ_S.TyphiCT18	121	EIETNVDATSTLLSEDSHAQEKLEKVEUREDDDDAEMTHSVAUNIVPAALIMPQITIVVVDI	180
PhoQ_WW012	121	EIETNVDATSTLLSEDSHAQEKLEKVEUREDDDDAEMTHSVAUNIVPAALIMPQITIVVVDI	180

PhoQ_25TBS	181	IPIELKRSVMVWSWFVYVLAANLLVLPILLWIAAMWSLRPEALAREVRELEDDHREMLN	240
PhoQ_33TXLD	181	IPIELKRSVMVWSWFVYVLAANLLVLPILLWIAAMWSLRPEALAREVRELEDDHREMLN	240
PhoQ_S.Typhimur..	181	IPIELKRSVMVWSWFVYVLAANLLVLPILLWIAAMWSLRPEALAREVRELEDDHREMLN	240
PhoQ_S.TyphiCT18	181	IPIELKRSVMVWSWFVYVLAANLLVLPILLWIAAMWSLRPEALAREVRELEDDHREMLN	240
PhoQ_WW012	181	IPIELKRSVMVWSWFVYVLAANLLVLPILLWIAAMWSLRPEALAREVRELEDDHREMLN	240

PhoQ_25TBS	241	PETTRELTSLVRNINQLLKSERERYNKYRTTLDLTHSLKTPFLAVLQSTLRSLRNEKMSV	300
PhoQ_33TXLD	241	PETTRELTSLVRNINQLLKSERERYNKYRTTLDLTHSLKTPFLAVLQSTLRSLRNEKMSV	300
PhoQ_S.Typhimur..	241	PETTRELTSLVRNINQLLKSERERYNKYRTTLDLTHSLKTPFLAVLQSTLRSLRNEKMSV	300
PhoQ_S.TyphiCT18	241	PETTRELTSLVRNINQLLKSERERYNKYRTTLDLTHSLKTPFLAVLQSTLRSLRNEKMSV	300
PhoQ_WW012	241	PETTRELTSLVRNINQLLKSERERYNKYRTTLDLTHSLKTPFLAVLQSTLRSLRNEKMSV	300

PhoQ_25TBS	301	SKAEFWMLEQISRSISQQIGYVHLHRAAMRGSGULLSRELHFVAPLLDNLISALNKVQRRG	360
PhoQ_33TXLD	301	SKAEFWMLEQISRSISQQIGYVHLHRAAMRGSGULLSRELHFVAPLLDNLISALNKVQRRG	360
PhoQ_S.Typhimur..	301	SKAEFWMLEQISRSISQQIGYVHLHRAAMRGSGULLSRELHFVAPLLDNLISALNKVQRRG	360
PhoQ_S.TyphiCT18	301	SKAEFWMLEQISRSISQQIGYVHLHRAAMRGSGULLSRELHFVAPLLDNLISALNKVQRRG	360
PhoQ_WW012	301	SKAEFWMLEQISRSISQQIGYVHLHRAAMRGSGULLSRELHFVAPLLDNLISALNKVQRRG	360

PhoQ_25TBS	361	VNISMDISFEISFVGEQNDVFVVMGNVLNACKYCLEFVEISARQTDHHLHIFVEDDGGF	420
PhoQ_33TXLD	361	VNISMDISFEISFVGEQNDVFVVMGNVLNACKYCLEFVEISARQTDHHLHIFVEDDGGF	420
PhoQ_S.Typhimur..	361	VNISMDISFEISFVGEQNDVFVVMGNVLNACKYCLEFVEISARQTDHHLHIFVEDDGGF	420
PhoQ_S.TyphiCT18	361	VNISMDISFEISFVGEQNDVFVVMGNVLNACKYCLEFVEISARQTDHHLHIFVEDDGGF	420
PhoQ_WW012	361	VNISMDISFEISFVGEQNDVFVVMGNVLNACKYCLEFVEISARQTDHHLHIFVEDDGGF	420

PhoQ_25TBS	421	IPHSKRSLVFDRGQADTLRFPGGQVGLAVAREITEQYAGQIIASDSLLGGARMEVVFGRQ	480
PhoQ_33TXLD	421	IPHSKRSLVFDRGQADTLRFPGGQVGLAVAREITEQYAGQIIASDSLLGGARMEVVFGRQ	480
PhoQ_S.Typhimur..	421	IPHSKRSLVFDRGQADTLRFPGGQVGLAVAREITEQYAGQIIASDSLLGGARMEVVFGRQ	480
PhoQ_S.TyphiCT18	421	IPHSKRSLVFDRGQADTLRFPGGQVGLAVAREITEQYAGQIIASDSLLGGARMEVVFGRQ	480
PhoQ_WW012	421	IPHSKRSLVFDRGQADTLRFPGGQVGLAVAREITEQYAGQIIASDSLLGGARMEVVFGRQ	480

PhoQ_25TBS	481	HPTQKEE	487
PhoQ_33TXLD	481	HPTQKEE	487
PhoQ_S.Typhimur..	481	HPTQKEE	487
PhoQ_S.TyphiCT18	481	HPTQKEE	487
PhoQ_WW012	481	HPTQKEE	487

Nota: A: secuencias de PhoP; B: secuencias de PhoQ. Las posiciones idénticas se colorean en color gris oscuro y los cambios respecto a las secuencias de referencia se señalan en los recuadros rojos. *S. Typhimur*: *S. Typhimurium* LT2. WW012: *S. Typhimurium* WW012.

Así mismo se encontraron sustituciones en las proteínas PmrC y PmrD. En esta última se presentó la sustitución L85S respecto a la referencia *Salmonella enterica* ser. Typhi CT18. (Figura 6). Por su parte, la secuencia de la proteína PmrC presentó una similitud del 98.72% entre las dos cepas de estudio, encontrando sustituciones al comparar con la cepa CT18 y LT2. En la Figura 7 se muestra el alineamiento de la proteína PmrC con la secuencia correspondiente en las cepas de referencia (*S. Typhimurium* LT2 y *S. Typhi* CT18) y en la cepa *S. Typhimurium* WW012. En la Tabla 15 se encuentran las sustituciones identificadas en PmrC para cada una de las cepas de estudio respecto a cada referencia.

Figura 6

Alineamiento de la proteína PmrD de los aislamientos de estudio

PmrD(EptA) 25TBS	1	MEWLVKKSHYVKKRACHVLVLCDSGGSLKMTAEANSMILLSPGDILSPQDAQYCINREK	60
PmrD(EptA) 33TXLD	1	MEWLVKKSHYVKKRACHVLVLCDSGGSLKMTAEANSMILLSPGDILSPQDAQYCINREK	60
PmrD <i>S. Typhimur</i> ..	1	MEWLVKKSHYVKKRACHVLVLCDSGGSLKMTAEANSMILLSPGDILSPQDAQYCINREK	60
PmrD <i>S. Typhi</i> CT18	1	MEWLVKKSHYVKKRACHVLVLCDSGGSLKMTAEANSMILLSPGDILSPQDAQYCINREK	60
PmrD_WW012	1	MEWLVKKSHYVKKRACHVLVLCDSGGSLKMTAEANSMILLSPGDILSPQDAQYCINREK	60

PmrD(EptA) 25TBS	61	HQTLKIVDARCYSCEWQRLTRKIS	85
PmrD(EptA) 33TXLD	61	HQTLKIVDARCYSCEWQRLTRKIS	85
PmrD <i>S. Typhimur</i> ..	61	HQTLKIVDARCYSCEWQRLTRKIS	85
PmrD <i>S. Typhi</i> CT18	61	HQTLKIVDARCYSCEWQRLTRKIL	85
PmrD_WW012	61	HQTLKIVDARCYSCEWQRLTRKIS	85

Nota: Las posiciones idénticas se colorean de color gris oscuro. Los cambios respecto a las secuencias de referencia se indican en los recuadros rojos.

Figura 7*Alineamiento de la proteína PmrC de los aislamientos de estudio*

PmrC(EptA)_25TBS	1	MLKRFLKRPVLGGQIANLLLSFYIAUCLNIAFYKQULQDLPLNSLRNVLFISMFVVAF	60
PmrC(EptA)_33TXLD	1	MLKRFLKRPVLGGQIANLLLSFYIAUCLNIAFYKQULQDLPLNSLRNVLFISMFVVAF	60
PmrC_S. Typhimur . .	1	MLKRFLKRPVLGGQIANLLLSFYIAUCLNIAFYKQULQDLPLNSLRNVLFISMFVVAF	60
PmrC_S. TyphiCT18	1	MLKRFLKRPVLGGQIANLLLSFYIAUCLNIAFYKQULQDLPLNSLRNVLFISMFVVAF	60
PmrC_WW012	1	MLKRFLKRPVLGGQIANLLLSFYIAUCLNIAFYKQULQDLPLNSLRNVLFISMFVVAF	60

PmrC(EptA)_25TBS	61	VVNSVLTLASFIWLNRLLAIVILUGAAQAQYFILTGYIIDRSMIANMDDTTPAETPALM	120
PmrC(EptA)_33TXLD	61	VVNSVLTLASFIWLNRLLAIVILUGAAQAQYFILTGYIIDRSMIANMDDTTPAETPALM	120
PmrC_S. Typhimur . .	61	VVNSVLTLASFIWLNRLLAIVILUGAAQAQYFILTGYIIDRSMIANMDDTTPAETPALM	120
PmrC_S. TyphiCT18	61	VVNSVLTLASFIWLNRLLAIVILUGAAQAQYFILTGYIIDRSMIANMDDTTPAETPALM	120
PmrC_WW012	61	VVNSVLTLASFIWLNRLLAIVILUGAAQAQYFILTGYIIDRSMIANMDDTTPAETPALM	120

PmrC(EptA)_25TBS	121	TPQMVLTLGLSGULAAVIAFWWKIRPATPLRSGLYRISVLISILLVILVAAPFYKDYA	180
PmrC(EptA)_33TXLD	121	TPQMVLTLGLSGULAAVIAFWWKIRPATPLRSGLYRISVLISILLVILVAAPFYKDYA	180
PmrC_S. Typhimur . .	121	TPQMVLTLGLSGULAAVIAFWWKIRPATPLRSGLYRISVLISILLVILVAAPFYKDYA	180
PmrC_S. TyphiCT18	121	TPQMVLTLGLSGULAAVIAFWWKIRPATPLRSGLYRISVLISILLVILVAAPFYKDYA	180
PmrC_WW012	121	TPQMVLTLGLSGULAAVIAFWWKIRPATPLRSGLYRISVLISILLVILVAAPFYKDYA	180

PmrC(EptA)_25TBS	181	SLFRNNKQLIAALSPSNSIVASWSWYSHQRLANLPLVRIGEDAHNPFMLKGDGRKNLTIL	240
PmrC(EptA)_33TXLD	181	SLFRNNKQLIAALSPSNSIVASWSWYSHQRLANLPLVRIGEDAHNPFMLKGDGRKNLTIL	240
PmrC_S. Typhimur . .	181	SLFRNNKQLIAALSPSNSIVASWSWYSHQRLANLPLVRIGEDAHNPFMLKGDGRKNLTIL	240
PmrC_S. TyphiCT18	181	SLFRNNKQLIAALSPSNSIVASWSWYSHQRLANLPLVRIGEDAHNPFMLKGDGRKNLTIL	240
PmrC_WW012	181	SLFRNNKQLIAALSPSNSIVASWSWYSHQRLANLPLVRIGEDAHNPFMLKGDGRKNLTIL	240

PmrC(EptA)_25TBS	241	IUGETSRGDDFSLGGYPRDINRLAKDDVIYFFHTTSCGTATAISVPCMFSDMPKRYHDE	300
PmrC(EptA)_33TXLD	241	IUGETSRGDDFSLGGYPRDINRLAKDDVIYFFHTTSCGTATAISVPCMFSDMPKRYHDE	300
PmrC_S. Typhimur . .	241	IUGETSRGDDFSLGGYPRDINRLAKDDVIYFFHTTSCGTATAISVPCMFSDMPKRYHDE	300
PmrC_S. TyphiCT18	241	IUGETSRGDDFSLGGYPRDINRLAKDDVIYFFHTTSCGTATAISVPCMFSDMPKRYHDE	300
PmrC_WW012	241	IUGETSRGDDFSLGGYPRDINRLAKDDVIYFFHTTSCGTATAISVPCMFSDMPKRYHDE	300

PmrC(EptA)_25TBS	301	ELAHHQEGLLDIIQAGINVLWINDGGCKGACDRVPHQNVTELNLPQCIDGECYDEVL	360
PmrC(EptA)_33TXLD	301	ELAHHQEGLLDIIQAGINVLWINDGGCKGACDRVPHQNVTELNLPQCIDGECYDEVL	360
PmrC_S. Typhimur . .	301	ELAHHQEGLLDIIQAGINVLWINDGGCKGACDRVPHQNVTELNLPQCIDGECYDEVL	360
PmrC_S. TyphiCT18	301	ELAHHQEGLLDIIQAGINVLWINDGGCKGACDRVPHQNVTELNLPQCIDGECYDEVL	360
PmrC_WW012	301	ELAHHQEGLLDIIQAGINVLWINDGGCKGACDRVPHQNVTELNLPQCIDGECYDEVL	360

PmrC(EptA)_25TBS	361	FHGLEIDIDHLKGDGVIVLHTIGSHGFTYNNRYPPQFKKFTPTCDINEIQNCSEQLINT	420
PmrC(EptA)_33TXLD	361	FHGLEIDIDHLKGDGVIVLHTIGSHGFTYNNRYPPQFKKFTPTCDINEIQNCSEQLINT	420
PmrC_S. Typhimur . .	361	FHGLEIDIDHLKGDGVIVLHTIGSHGFTYNNRYPPQFKKFTPTCDINEIQNCSEQLINT	420
PmrC_S. TyphiCT18	361	FHGLEIDIDHLKGDGVIVLHTIGSHGFTYNNRYPPQFKKFTPTCDINEIQNCSEQLINT	420
PmrC_WW012	361	FHGLEIDIDHLKGDGVIVLHTIGSHGFTYNNRYPPQFKKFTPTCDINEIQNCSEQLINT	420

PmrC(EptA)_25TBS	421	YDNTVLYVDYIVDKAINLLKSHQKFTTSLVYLSDHGSELGENGUYLHGLPYSIAPDTQR	480
PmrC(EptA)_33TXLD	421	YDNTVLYVDYIVDKAINLLKSHQKFTTSLVYLSDHGSELGENGUYLHGLPYSIAPDTQR	480
PmrC_S. Typhimur . .	421	YDNTVLYVDYIVDKAINLLKSHQKFTTSLVYLSDHGSELGENGUYLHGLPYSIAPDTQR	480
PmrC_S. TyphiCT18	421	YDNTVLYVDYIVDKAINLLKSHQKFTTSLVYLSDHGSELGENGUYLHGLPYSIAPDTQR	480
PmrC_WW012	421	YDNTVLYVDYIVDKAINLLKSHQKFTTSLVYLSDHGSELGENGUYLHGLPYSIAPDTQR	480

PmrC(EptA)_25TBS	481	HVPMLIWLSKDYQQRVQDQACLQKRASLTLDYSQDNLFSTMLGLTGUVITYYQAADDHLC	540
PmrC(EptA)_33TXLD	481	HVPMLIWLSKDYQQRVQDQACLQKRASLTLDYSQDNLFSTMLGLTGUVITYYQAADDHLC	540
PmrC_S. Typhimur . .	481	HVPMLIWLSKDYQQRVQDQACLQKRASLTLDYSQDNLFSTMLGLTGUVITYYQAADDHLC	540
PmrC_S. TyphiCT18	481	HVPMLIWLSKDYQQRVQDQACLQKRASLTLDYSQDNLFSTMLGLTGUVITYYQAADDHLC	540
PmrC_WW012	481	HVPMLIWLSKDYQQRVQDQACLQKRASLTLDYSQDNLFSTMLGLTGUVITYYQAADDHLC	540

PmrC(EptA)_25TBS	541	FCRRLLSE	547
PmrC(EptA)_33TXLD	541	FCRRLLSE	547
PmrC_S. Typhimur . .	541	FCRRLLSE	547
PmrC_S. TyphiCT18	541	FCRRLLSE	547
PmrC_WW012	541	FCRRLLSE	547

Nota: Las posiciones idénticas se colorean de color gris oscuro. Las sustituciones en la secuencia de la cepa 25TBS respecto a las secuencias de referencia se indican en los recuadros rojos; las sustituciones en la secuencia de la cepa 33TXLD se indican en los recuadros azules. *S. Typhimur*: *S. Typhimurium* LT2; WW012: *S. Typhimurium* WW012.

Tabla 15*Sustituciones identificadas en la proteína PmrC en las dos cepas de estudio*

Cepas de referencia/ Sustituciones	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium LT2	<i>Salmonella enterica</i> ser. Typhi CT18
En 25TBS	F59L	F59L
	-	I81V
	A193S	A193S
	D366N	D366N
	E415Q	-
	K445R	K445R
En 33TXLD	A159V	A159V
	V161I	V161I
	R263L	R263L
	E415Q	-

Nota: Se señala en negrilla la sustitución que comparten las dos cepas de estudio.

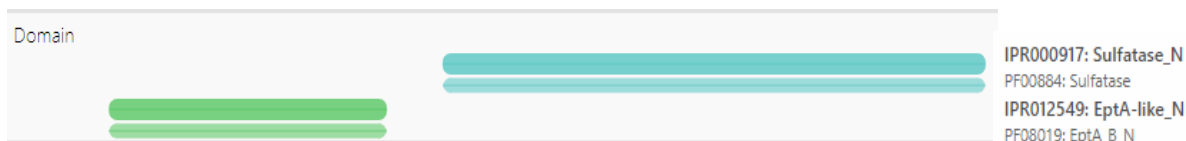
Con respecto a la búsqueda de dominios similares a los que conforman la proteína transferasa de fosfoetanolamina MCR (Figura 8), en dos de las proteínas del aislamiento 25TBS (25TBS_01991 y 25TBS_02780) se encontraron los dominios descritos para una transferasa de fosfoetanolamina: EptA-like_N y Sulfatasa (Figura 8); además en otras cuatro proteínas también se identificó este último dominio (Apéndice G). Cabe destacar que la proteína 25TBS_00962 fue anotada en Prokka como hipotética y mediante la búsqueda en InterProScan se determinó la presencia del dominio sulfatasa en esta proteína. En cuanto al genoma del aislamiento 33TXLD, en las proteínas 33TXLD_04384 y 33TXLD_02548 se encontraron los dominios descritos para una transferasa de fosfoetanolamina (Figura 8); adicionalmente el dominio sulfatasa fue también

identificado en nueve proteínas más, tres de las cuales fueron anotadas como proteínas hipotéticas en Prokka (Apéndice G).

Figura 8. Clasificación de la proteína MCR-1.1 en InterProScan

Protein family membership

F Phosphoethanolamine transferase (IPR040423)



Nota: clasificación de familia y dominio de MCR-1.1 de *S. Typhimurium* (acceso Genbank RWU66024.1).

La Tabla 16 muestra la comparación entre los dominios de la transferasa de fosfoetanolamina de los aislamientos de estudio y los dominios de las proteínas asociadas con la resistencia a colistina usadas como referencia (Apéndice F), y se evidencia que comparten la misma estructura. Finalmente cabe mencionar que en las proteínas en que sólo se identificó el dominio sulfatasa, cuatro proteínas en 25TBS y nueve en 33TXLD, este hacía parte de proteínas no asociadas con la resistencia a colistina, por lo cual no fueron tenidos en cuenta en los análisis posteriores.

Tabla 16

Comparación de los dominios de la proteína transferasa de fosfoetanolamina en los aislamientos de estudio y los aislamientos de referencia

Aislamiento	Proteína	Dominios identificados
25TBS	25TBS_01991	
	25TBS_02780	
33TXLD	33TXLD_02548	
	33TXLD_04384	
<i>S. Typhimurium</i>	MCR-1.1	
<i>S. Typhimurium</i> LT2	EptA	
<i>S. Infantis</i>	EptA	
<i>S. Newport</i>	EptA	
<i>S. Typhimurium</i> LT2	EptB	

Nota: los dominios se graficaron con la herramienta *domain graphics generator* (https://pfam.xfam.org/generate_graphic).

Con respecto a la similitud entre las proteínas transferasa de fosfoetanolamina identificadas y las proteínas asociadas a la resistencia a colistina, los mayores porcentajes de identidad se encontraron entre la proteína 25TBS_01991 y la proteína EptA del aislamiento *S. Typhimurium* LT2, y la proteína 25TBS_02780 con la proteína EptB, para el caso del aislamiento 25TBS; por su parte, en el aislamiento 33TXLD, el mayor porcentaje de identidad se dio entre la proteína 33TXLD_02548 y EptA de *S. Infantis*, así como entre 33TXLD_04384 y la proteína EptB. En

cuanto al porcentaje de identidad de las proteínas identificadas con la proteína plasmídica (MCR) se observa que en todos los casos fue < 31 % (Tabla 17).

Tabla 17

Porcentaje de identidad entre las proteínas encontradas en InterProScan y las proteínas de interés

Proteínas de referencia	25TBS		33TXLD	
	% ID	% ID	% ID	% ID
	25TBS_01991	25TBS_02780	33TXLD_02548	33TXLD_04384
MCR-1.1*	30.10	21.68	30.58	21.51
EptA (<i>S. Typhimurium</i> LT2)	99.86	21.90	99.26	21.57
EptA (<i>S. Infantis</i>)*	98.72	21.57	100	21.40
EptA (<i>S. Newport</i>)*	98.90	21.40	99.45	21.23
EptB (<i>S. Typhimurium</i> LT2)	21.57	99.64	21.40	99.64

Nota: %ID significa porcentaje de identidad. Se resaltan en negrilla los porcentajes de identidad más altos.

*Aislamientos resistentes a colistina.

5.6 Caracterización plasmídica

En el ensamblaje de plásmidos con plasmidSPAdes para el genoma 25TBS se encontraron 17 *contigs* que podrían pertenecer a un plásmido designado por el programa como “*component_0*”³. Por su parte, para el genoma 33TXLD de los 58 *contigs* identificados 57 fueron asignados al plásmido “*component_0*” y 1 al “*component_1*”. Sin embargo, después de la

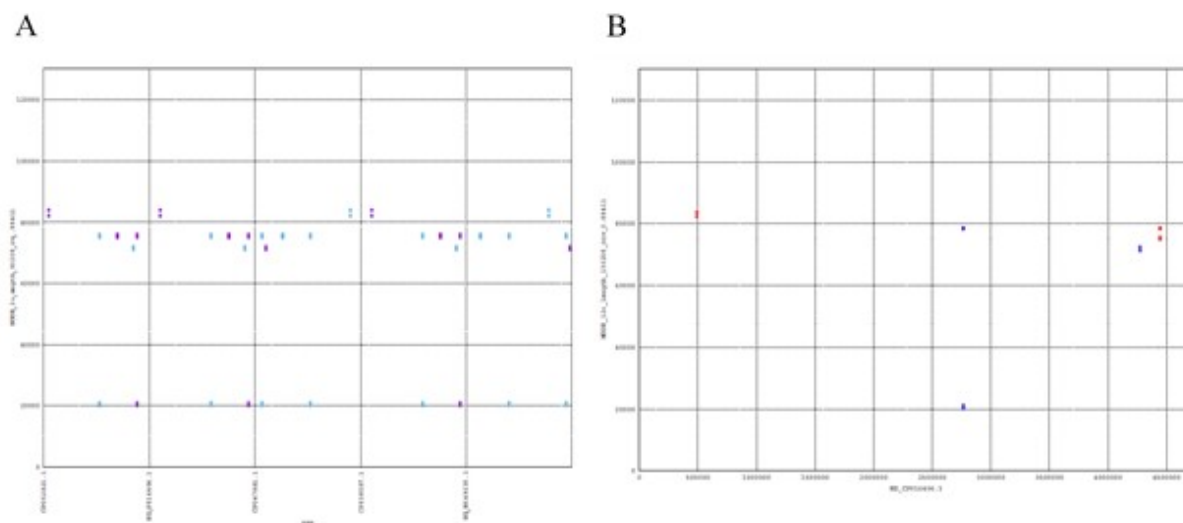
³ Para todos los nombres de *contigs* en *contigs.fasta*, *scaffolds.fasta* y *assembly_graph.fastg* PlasmidSPAdes adiciona el sufijo *_component_X*, donde X es el id del plásmido putativo al cual pertenece el *contig*

verificación de estos resultados con plasmidVerify y viralVerify solamente uno de estos *contigs* (*contig* 4, del aislamiento 33TXLD) fue clasificado como plasmídico, por tanto, sólo este *contig* fue tenido en cuenta para los análisis posteriores. Por otra parte, usando metaplasmidSPAdes no se obtuvieron ensamblajes plasmídicos.

Con respecto al análisis de *contigs* con *misassemblies* reportados en los ensamblajes, al realizar el alineamiento de dichos *contigs* (Tabla 7) con los genomas de referencia usados en QUAST, se encontraron principalmente duplicaciones invertidas y regiones de no alineamiento (*gaps*). Estas regiones de no alineamiento podrían indicar la presencia de regiones exclusivas o inserciones en los genomas de estudio y fueron encontrados en el *contig* 2 del genoma de 25TBS y en el *contig* 12 de 33TXLD (Apéndice C y Figura 9). Sin embargo, al revisar la anotación de las regiones con *gaps* del *contig* 2 se estableció que estas no eran de origen plasmídico.

Figura 9

Alineamiento del contig 12 usando Mashmap y Nucmer



Nota: A y B corresponden a las gráficas de alineamiento del *contig* 12 (130208 pb) con los genomas de referencia usando Mashmap y Nucmer respectivamente, en las cuales se evidencia el no alineamiento del *contig*. En el caso del alineamiento con Nucmer se muestra la gráfica con la referencia NZ_CP016406.1, con las demás se obtuvo el mismo resultado.

Al revisar la anotación del *contig* 12 se encontraron genes que han sido descritos en el megaplásmido pESI (*plasmid of emerging Salmonella enterica* ser. Infantis) tales como: genes de los sistemas toxina-antitoxina *pemI/pemK* y *ccdA/ccdB*, genes del *cluster* fimbrial *klf*, genes del operon yersiniabactina y secuencias de inserción (ISEc39, ISSod4 y ISRor2) (Aviv et.al., 2014). El alineamiento de este *contig* con los genomas plasmídicos de referencia (megaplásmidos tipo pESI, Tabla 8) mostró que alinea en su totalidad (130208 pb) con cada uno de los megaplásmidos. Los alineamientos se muestran en la Figura 10 y Apéndice D.

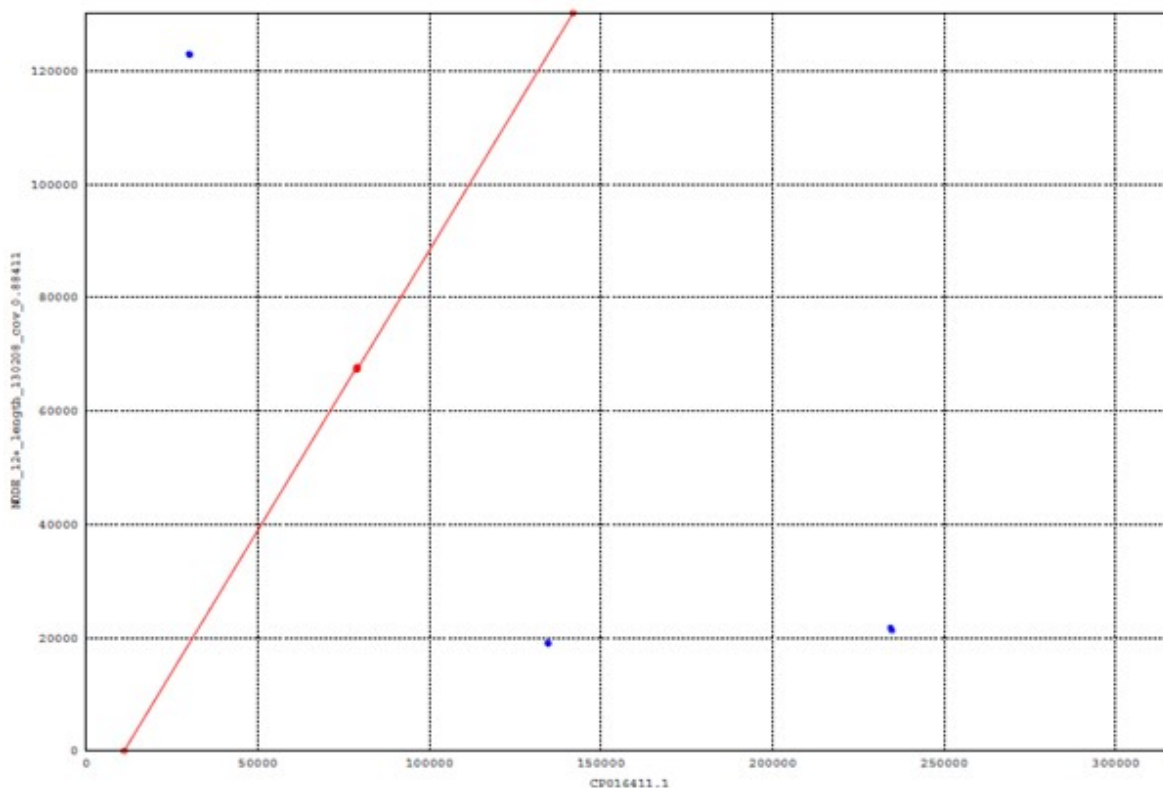
Tabla 18

Plásmidos de referencia usados para el alineamiento con el contig 12

Plásmido	Referencia	Número de acceso
pESI119944	Cohen et al., 2020	Genbank NZ_CP047882.1
pESI2747	García-Soto et al., 2020	ENA CAJCKB010000002 CAJCKB010000002.1
pN55391	Tate et al., 2017	Genbank CP016411.1

Figura 10

Alineamiento entre el plásmido pN55391 y el contig 12 usando Nucmer



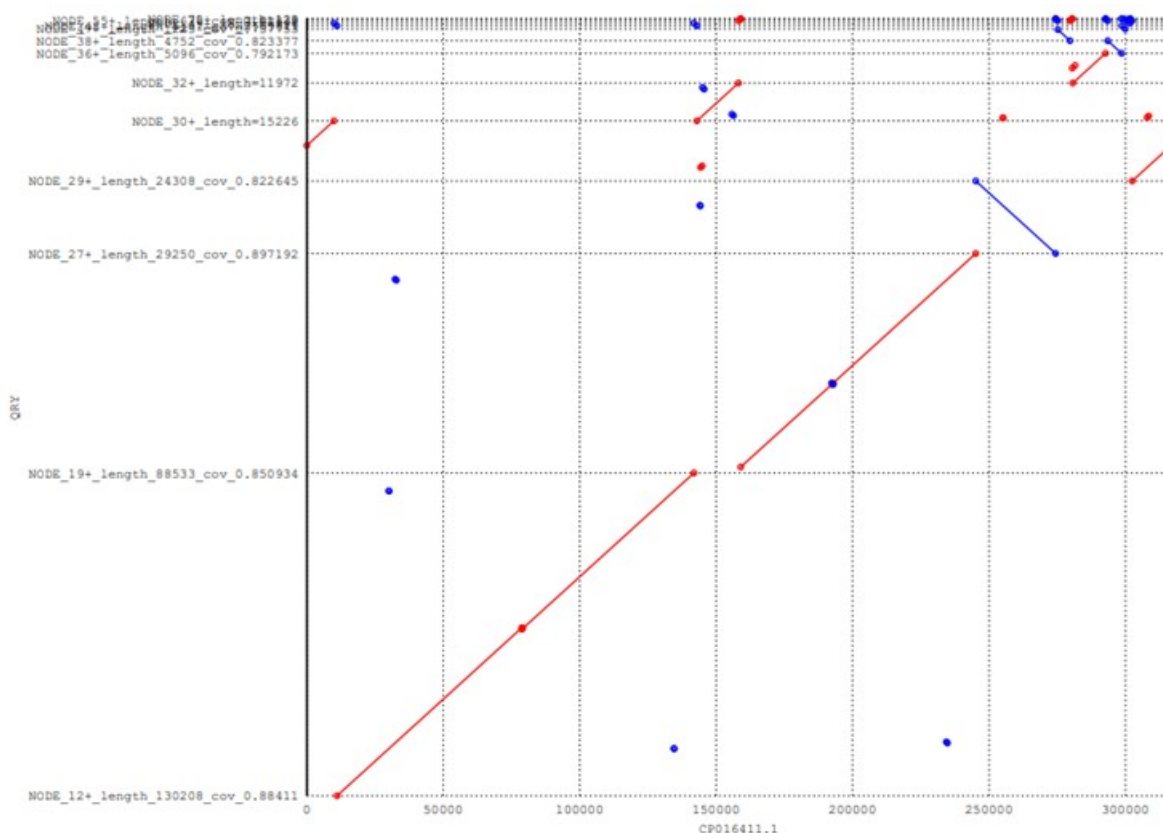
Nota: El eje X corresponde al plásmido pN55391 y el eje Y corresponde al *contig 12*. Los alineamientos se graficaron usando mummerplot.

Teniendo en cuenta que el *contig 12* cubre aproximadamente entre un 41 a 47% del tamaño de los genomas pESI de referencia, se realizó el alineamiento entre el genoma completo del aislamiento 33TXLD y cada uno de los genomas de referencia, con el fin de determinar si el genoma de 33TXLD poseía los *contigs* faltantes que completan el megaplásmido. Los resultados obtenidos evidencian que la totalidad de cada uno de los plásmidos de referencia es cubierta por *contigs* presentes en el genoma del aislamiento 33TXLD, aunque no de forma continua, observándose *gaps* entre algunos de los *contigs* (Apéndice E y H). El alineamiento entre el megaplásmido pN55391 y los *contigs* del genoma de 33TXLD que cubren esta referencia se

observa en la Figura 11. El megaplásmido de tipo pESI identificado fue designado como p33TXLD.

Figura 11

Alineamiento del megaplásmido pN55391 y los contigs del genoma de 33TXLD



Nota: El eje X (CP016411.1) corresponde al genoma del megaplásmido pN55391 y el eje Y (QRY) son los a los *contigs* (*nodes*) del genoma 33TXLD. Alineamiento con Nucmer graficado con mummerplot.

Los resultados obtenidos del *scaffolding* de los *contigs* que forman el megaplásmido identificado se presentan en el Apéndice I y J, y en estos se evidencia que se logró eliminar los *gaps* que estaban presentes entre algunos de los *contigs*. Respecto al porcentaje de similitud entre los *scaffolds* de p33TXLD y los genomas plasmídicos de referencia., de acuerdo con el valor de ANI, la mayor similitud se presenta con el genoma del megaplásmido pN55391 (Tabla 19).

Tabla 19*ANI del megaplásmido p33TXLD*

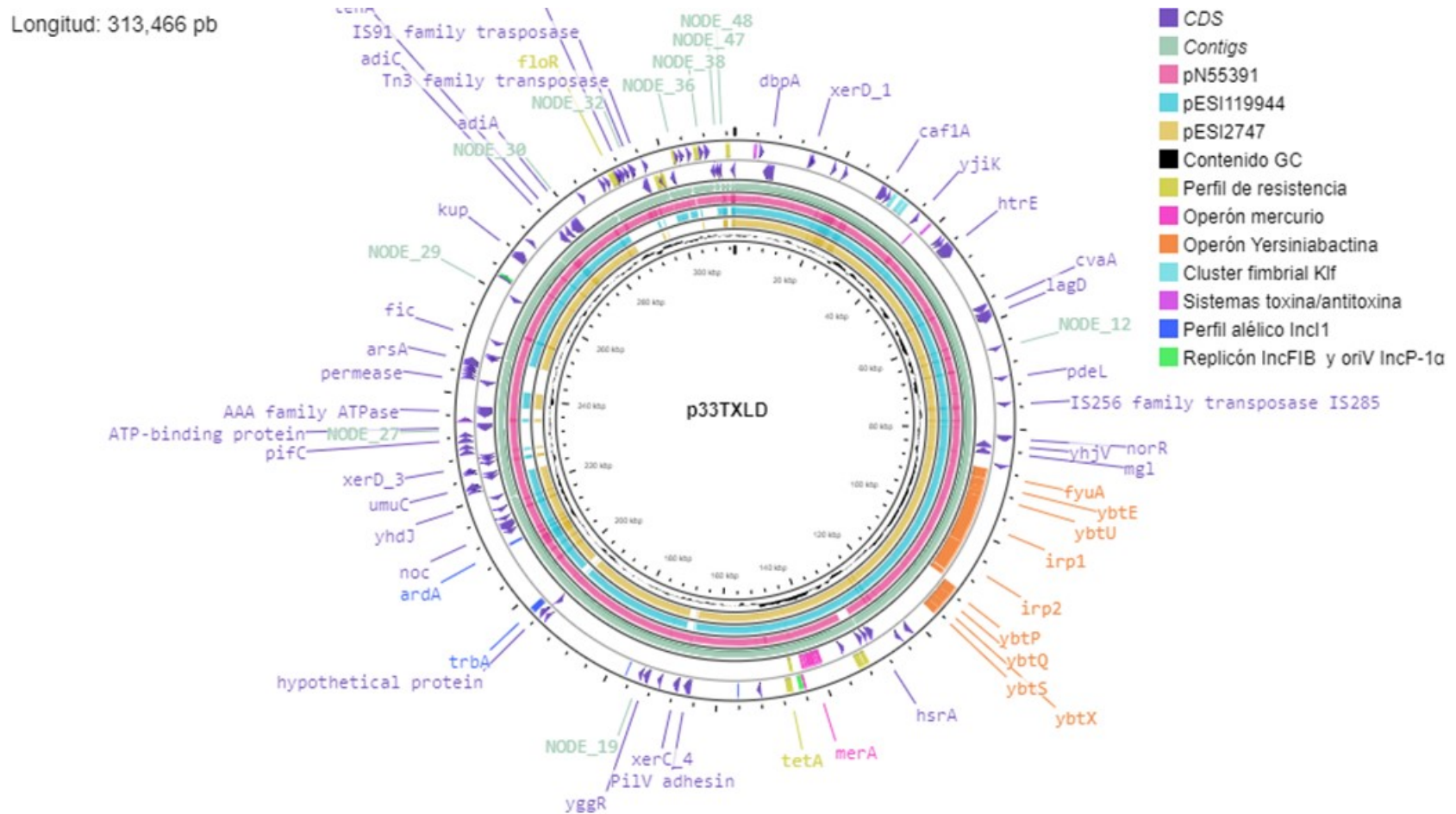
Genoma de comparación	Valor ANI (%)
pESI119944	99.36
pN55391	99.96
pESI2747	99.28

Finalmente, la anotación del megaplásmido p33TXLD, así como la comparación con los tres genomas plasmídicos de referencia se observa en la Figura 12. Las gráficas del patrón de resistencia, características de virulencia y *fitness*⁴, tipificación y elementos móviles se presentan en los Apéndices L, M, N y O.

⁴ *fitness* entendido como la capacidad de los microorganismos para prosperar en un entorno competitivo (Schaechter, 2019).

Figura 12.

Anotación con Prokka y comparación con BLAST para megaplásmido p33TXLD.



Nota: En la gráfica se observa el alineamiento de p33TXLD con los plásmidos de referencia. El programa utilizado fue CGView Server.

5.6.1 Búsqueda de plásmidos

Para el aislamiento 25TBS, en el proceso de verificación mediante plasmidVerify y viralVerify, de los *contigs* obtenidos con Unicycler y plasmidSPAdes, ninguno de estos fue clasificado como plasmídico. Por otra parte, la clasificación de los *contigs* de SPAdes mediante plasmidVerify permitió la selección del *contig* 15 como plasmídico. Sin embargo, la revisión de la anotación de este *contig* no evidenció genes que permitieran inferir la presencia de plásmidos, por lo tanto, este *contig* no fue tenido en cuenta en los análisis posteriores.

Otra de las estrategias utilizadas para la búsqueda de *contigs* plasmídicos fue el análisis de la variación en la profundidad, en el cual para el aislamiento 25TBS se encontraron cinco *contigs* con profundidad superior a dos veces la desviación estándar, sin embargo, ninguno de los mismos correspondía a regiones de codificación (CDS).

Por último, la búsqueda de plásmidos a partir del ensamblaje obtenido con Unicycler utilizando PLSDB identificó el plásmido pSE81-1705-3 (NZ_CP018654.1) con un 0.9917 de identidad y *p-value* de 0. El posterior alineamiento de este plásmido con el ensamblaje usando Nucmer evidenció que la secuencia del plásmido alinea en su totalidad (33784 pb) con un 98-99% de identidad con el *contig* 1 del genoma del aislamiento 25TBS (Apéndice K).

Por otra parte, para el aislamiento 33TXLD plasmidVerify y viralVerify reportaron un mayor número de *contigs* plasmídicos que en el aislamiento 25TBS a partir de los ensamblajes de Unicycler y SPAdes (Tabla 20).

El alineamiento entre los *contigs* plasmídicos obtenidos de los tres ensambladores permitió establecer las regiones de correspondencia entre los mismos, las cuales se muestran en la Tabla 21. Cabe resaltar que no en todos los casos esta correspondencia presenta el mismo tamaño y que

el resultado de la clasificación de los *contigs* plasmídicos fue similar entre los *contigs* obtenidos de Unicycler y SPAdes (Tabla 20), y diferente a los obtenidos a partir de plasmidSPAdes.

Tabla 20

Contigs clasificados como plasmídicos por plasmidVerify y viralVerify en el genoma del aislamiento 33TXLD

Cepa	Ensamblaje Unicycler		Ensamblaje SPAdes		Ensamblaje plasmidSPAdes	
	Plasmid-Verify	ViralVerify	Plasmid-Verify	Viral-Verify	Plasmid-Verify	Viral-Verify
33TXLD		12, 19, 27,		20, 23, 24,		
	12, 19, 27,	29, 32, 36,		30, 31, 34,		
	29, 32, 48,	55, 38*,	20, 23, 24, 30,	35, 38, 54	4	4 ^l
	55	42*, 45 ^l , 47*, 48*	31, 34, 50, 54	44*, 47*, 50*, 71*		

Nota: *Clasificado como intermedio por el programa.

Tabla 21

Correspondencia o regiones de correspondencia entre los contigs plasmídicos de Unicycler y SPAdes

Unicycler		SPAdes	
Contig	Tamaño (pb)	Contig	Tamaño (pb)
12	130208	23	67485
		24	62970
19	88533	20	88708
27	29250	30	29402
29	24308	31	24460
32	11972	34	12123
48	1101	50	1101

55	671	54	671
36, 70*, 47	5096, 128, 1225	35	6603
38	4901	38	4752
42**	2497	44	2649
45**	1312	47	1312
35*	5428	71	194

Nota: *No clasificado como plasmídico. **Excepto estos *contigs*, todos los *contigs* clasificados como plasmídicos (nomenclatura de Unicycler) forman parte del megaplásmido p33TXLD.

El *contig* 4 de plasmidSPAdes alinea en su totalidad (11945 pb) con la región comprendida entre 233095 pb a 245039 pb del *contig* 1 de Unicycler y SPAdes, sin embargo, el *contig* 1 no fue clasificado como plasmídico, probablemente porque este tiene una longitud mucho mayor (1195125 pb) que el *contig* 4. Del mismo modo, aunque todo el *contig* 71 (194 pb) de SPAdes alinea con la región 4992 pb a 5185 pb del *contig* 35 de Unicycler, este último no fue clasificado como plasmídico, esto puede deberse a que el *contig* 71 solo corresponde al 3.6% de la longitud del *contig* 35 y no a la totalidad del mismo. Algo similar sucede con el *contig* 35 (6603 pb) de SPAdes el cual alinea con el *contig* 70 (128 pb) de Unicycler, pero este último no fue clasificado como plasmídico.

Respecto al análisis de la variación en la profundidad de los *contigs* obtenidos con Unicycler para el aislamiento 33TXLD, 11 de estos tuvieron una profundidad superior a dos veces la desviación estándar, de los cuales solo el *contig* 55 correspondía a una región codificante, identificada como una IS26 que hace parte de la familia de transposasa IS6. Por su parte, a partir del ensamblaje con SPAdes se encontraron 35 *contigs* con profundidad superior a dos veces la desviación estándar, de los cuales seis (37, 47, 49, 50, 53 y 54) contenían regiones codificantes tales como *ccmC*, *ccmD*, *ccmE*, *ccmF_2*, *dsbE*, *ccmH*, ISSen1, ISEc40, IS200F, IS26 y una proteína hipotética.

Finalmente, la búsqueda de plásmidos a partir del ensamblaje obtenido con Unicycler usando la base de datos PLSDB identificó 17 plásmidos con identidades entre 0.9906 y 1.0, de los cuales los plásmidos pCRE-236-3 (NZ_CP061383.1) y pESBL243 (NZ_MT230230.1) fueron también encontrados mediante la búsqueda a partir del ensamblaje del megaplásmido (p33TXLD), indicando que hacen parte de este; por lo anterior sólo 15 de los 17 plásmidos fueron usados para el alineamiento con el ensamblaje completo usando BLAST. Los tres plásmidos que alinearon solo con *contigs* diferentes a los que forman el megaplásmido se observan en la Tabla 22.

Tabla 22.

Plásmidos que alinearon con contigs diferentes a los que forman el megaplásmido

ID plásmido (Subject)	Plásmido PLSDB	Contigs (Query)	Identidad (%)	Longitud alineamiento	Longitud Query (pb)	Longitud Subject (pb)
NZ_CP030 201.1	pSA20051 401.5 ¹	1	99.835	1814	1195125	1814
NZ_CP018 654.1	pSE81- 1705-3 ²	1	99.058 98.093 99.110	20407 4771 8654	1195125	33784
NZ_CP019 203.1	pCFSAN0 03307 ³	-	-	-	-	-

Nota: El plásmido pCFSAN003307 alinea con múltiples *contigs*, por tanto, la información de las columnas tres a siete no se presenta en la tabla. Identidad y *p-value* en PLSDB: ¹0.9991, 0; ²0.9908, 0; ³0.9948, 0.

Vale la pena recalcar que inicialmente p33TXLD fue encontrado mediante el análisis detallado de los *misassemblies* y posteriormente mediante la verificación con plasmidVerify y viralVerify se encontraron 10 de los 13 *contigs* que hacen parte de este megaplásmido.

5.6.2 Tipificación plasmídica.

Para el plásmido pSE81-1705-3 identificado en el aislamiento 25TBS el programa PlasmidFinder no identificó ningún replicón plasmídico. Por otra parte, en el megaplásmido p33TXLD se identificaron los genes *ardA11*, *trbA8*, *sogS14*, *piL3* y *repB* con 100% de identidad y cobertura. Este último hace parte del replicón IncFIB y fue también reportado por el programa PlasmidFinder. Los cuatro genes restantes hacen parte del perfil alélico del replicón IncII. Cabe mencionar que el gen *repII* que hace parte de este perfil, no se encontró en el megaplásmido, por tanto, no fue posible determinar su secuentiotipo. Adicionalmente, se identificó un origen de replicación (*oriV*) del grupo de incompatibilidad IncP1- α .

Con respecto a los dos plásmidos adicionales identificados en la cepa 33TXLD (pSE81-1705-3 y pSA20051401.5, Tabla 22), en la tipificación mediante el programa PlasmidFinder, no se identificó ningún replicón plasmídico.

5.6.3 Búsqueda de plásmidos conjugativos

En el alineamiento realizado con blastp del genoma anotado de 25TBS con las proteínas que conforman el sistema conjugativo, no se obtuvieron alineamientos con *locus* ubicados en el *contig 1*, el cual es el *contig* en el que se encontró el plásmido pSE81-1705-3.

Por otra parte, en el alineamiento de las proteínas conjugativas de plásmidos tipo F con la anotación del p33TXLD, no se obtuvieron *hits* con más del 90% de identidad y fracción de alineamiento del *query* con ninguna de estas proteínas. En el caso del alineamiento con las proteínas de conjugación de los megaplásmidos de tipo pESI, se obtuvieron porcentajes de identidad y fracción de alineamiento del *query* mayores a 90% con 54 de estas, porcentajes menores a 90% se obtuvieron con siete de las proteínas (PilV, TraY, ExcA, YgdB, ArdA, YfcB y

YfaA), y con cinco de las proteínas no se obtuvo alineamiento (YgfA, YgbA, YffB, YfaA y ParA) (Apéndice P).

En cuanto a la búsqueda de proteínas conjugativas en los plásmidos adicionales del aislamiento 33TXLD, no se presentó alineamiento con ninguna de las proteínas conjugativas de la base de datos.

6. Discusión

Salmonella enterica es un patógeno alimentario que comprende más de 2600 serovariedades. Las infecciones con *Salmonella* spp. resistente a antimicrobianos han venido en aumento y representan una amenaza global (Brown et.al., 2021; Pornsukarom et.al., 2018). La secuenciación del genoma completo se está convirtiendo en el método de elección y estándar de oro para la subtipificación de *Salmonella*, transformando la forma en que se caracterizan las cepas de este género (Tang et.al., 2019). Independientemente de la tecnología de secuenciación utilizada, antes de usar las secuencias crudas es necesario realizar un control de calidad, con el fin de asegurar que los datos no tienen problemas o sesgos que puedan interferir en los futuros análisis (Cortese et.al., 2021).

De acuerdo con lo anterior, los datos obtenidos de la secuenciación del genoma completo de los dos aislamientos de estudio fueron analizados para evaluar su calidad. Como se mencionó en la sección de resultados, los valores de calidad reportados por el secuenciador y mediante FastQC mostraron la buena calidad de las lecturas en los dos genomas de estudio. Lo anterior se evidencia porque de acuerdo con el reporte del secuenciador, más del 95% de las bases tuvieron un valor $Q \geq 30$, lo cual fue confirmado por el resultado del módulo de calidad de secuencia por

base, en el cual todas las bases obtuvieron un valor $Q > 30$, lo que indica una probabilidad del 99.9 % de que la base asignada sea correcta, es decir se obtuvieron llamadas de alta calidad (Illumina, 2011; Goswami & Sanan-Mishra, 2022). Así mismo, no se encontraron secuencias de adaptadores ni sobrerrepresentadas y no existen Ns en las secuencias analizadas; además, los módulos de calidad de secuencia por base, calidad por secuencia, contenido de secuencia por base y distribución de la longitud de las secuencias se encuentran en los rangos normales, lo que refleja la buena calidad de las secuencias. Sumado a lo anterior, tanto la cobertura estimada con la ecuación de Lander/Waterman como la cobertura observada, fue superior al valor solicitado (aprox. 400x) y se encuentra por encima de la cobertura recomendada para que un genoma sea considerado de calidad (entre 35x-50x) (Desai et.al., 2013), lo anterior se presentó para los dos genomas de estudio.

El ensamblaje de los genomas analizados fue realizado de *novo* que consiste en reconstruir el genoma sin usar un genoma de referencia. Se realizó de esta manera porque este tipo de ensamblaje permite identificar características únicas del aislamiento de estudio. Una reconstrucción precisa del genoma es clave debido a que la calidad del ensamblaje puede afectar los resultados de los análisis posteriores, sin embargo, el ensamblaje de *novo* aún presenta numerosos desafíos técnicos y computacionales debido a la presencia de regiones altamente repetitivas, regiones con un contenido muy alto de GC o AT y sesgos de secuenciación introducidos en la PCR (X. Liao et.al., 2019). Actualmente están disponibles muchas herramientas de ensamblaje, pero estas difieren mucho en su rendimiento y resultado final (Bradnam et.al., 2013). Por tanto, algunos autores recomiendan aplicar un enfoque híbrido usando dos o más *softwares* de ensamblaje (Kulski, 2016). Para el ensamblaje de los genomas de estudio se utilizó el *software* SPAdes, diseñado para ensamblar genomas bacterianos a partir de lecturas cortas de Illumina (Bankevich et al., 2012), y el *software* Unicycler, que también se utiliza para el

ensamblaje de genomas bacterianos y ofrece la ventaja de probar una amplia gama de tamaños de *k-mer* y generar gráficas de ensamblaje más limpias con *contigs* largos y sin *dead ends* (Wick et.al., 2017).

La evaluación y selección del ensamblaje de mayor calidad se logró mediante las herramientas QUAST y BUSCO. Respecto al número de *contigs*, en Unicycler se obtienen menos de la mitad del número de *contigs* obtenidos en SPAdes, indicando una mejor reconstrucción del genoma con Unicycler; del mismo modo la longitud total obtenida con este ensamblador fue más cercana a la longitud del genoma de referencia con la mayoría de los genomas de comparación utilizados; así mismo, el N50 fue mayor comparado con el obtenido en el ensamblaje de SPAdes para todos los genomas de referencia usados, evidenciando que los fragmentos reconstruidos son más largos y una mejor contigüidad del genoma. Finalmente, con todos los genomas de referencia, el número de *misassemblies* fue menor en Unicycler. Estos resultados evidenciaron la mayor calidad del ensamblaje realizado con Unicycler y por tanto este fue seleccionado para continuar los análisis.

La genotipificación de los aislamientos a partir de los genomas ensamblados permitió la identificación de *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Newport secuenciotipo 2370 para el aislamiento 25TBS y *Salmonella enterica* subespecie enterica serovariedad Infantis secuenciotipo 32 para el aislamiento 33TXLD. *Salmonella enterica* representa la especie más patógena en humanos y animales e incluye más de 2600 serovariedades. Dentro de las serovariedades epidemiológicamente relevantes se encuentra *S. Newport*, la cual está asociada con una alta carga de brotes por alimentos, principalmente por el consumo de aves de corral y productos derivados de las mismas. El incremento de cepas MDR de esta serovariedad plantea un grave problema de salud pública. *S. Newport* es considerada epidémica en numerosos países del

mundo como Canadá, Estados Unidos, Austria, España, China, Nigeria, entre otros (EFSA & ECDC., 2019; Jajere, 2019; Koutsoumanis et.al., 2019; Olaitan et.al., 2015).

De acuerdo con la búsqueda realizada en la literatura no se encontraron reportes de *S. Newport* ST2370; sin embargo, se encuentran registros en bases de datos como Genbank del NCBI (Clark et.al., 2016) y Enterobase (Achtman et.al., 2020), de genomas de este secuenciotipo obtenidos de alimentos como queso y hojas de hierba santa en Estados Unidos, México y Nicaragua. En el caso de Colombia, este secuenciotipo ha sido identificado en el té de camomila (*Matricaria recutita* L.) (Achtman et.al., 2020) y en nuestro conocimiento este sería el primer reporte de *Salmonella enterica* ser. Newport ST2370 aislada de pollo.

La búsqueda de determinantes de resistencia en este aislamiento mostró la presencia de genes y sustituciones que podrían conferir resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, betalactámicos de bajo espectro, fosfomicina, elfamicinas y polimixinas, así como la presencia de genes codificantes de bombas de eflujo de múltiples fármacos. De acuerdo con la literatura la resistencia a quinolonas suele darse principalmente por sustituciones puntuales en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* (H. M. Chen et.al., 2013), siendo las sustituciones en *gyrA* y *parC* las principales mediadoras de la resistencia a quinolonas en *Salmonella* spp. (Hopkins et.al., 2007; Qian et.al., 2020). Por su parte, los determinantes de la resistencia mediada por plásmidos (PMQR), genes *qnr* y *aac (6')-Ib-cr* también se han asociado con la resistencia o con la disminución de sensibilidad a esta clase de antibióticos (Qian et.al., 2020).

En este trabajo, la cepa *S. Newport* 25TBS presentó las sustituciones T57S y A620T en el gen *parC* y no se identificaron sustituciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parE*, ni presencia de ningún determinante PMQR. La sustitución T57S ha sido frecuentemente observada en aislamientos de

Salmonella enterica resistentes a quinolonas en diversos estudios (Ling et.al., 2003, Mała et.al., 2018; Whichard et.al., 2007), mientras que la sustitución A620T fue reportada por PointFinder como una sustitución desconocida y no se encontró reporte de la misma en aislamientos de *S. Newport* en la literatura consultada. Cabe resaltar que esta sustitución ha sido identificada en serovariedades como *Salmonella enterica* ser. 4,5,12:i:- y *Salmonella enterica* ser. Gloucester resistentes a ácido nalidíxico y/o ciprofloxacina. Sin embargo, aún no se ha confirmado que estos cambios sean los que confieran la resistencia observada fenotípicamente (Li et.al., 2021; Win et.al., 2021).

Teniendo en cuenta que en resultados anteriores⁵ este aislamiento presentó resistencia fenotípica al ácido nalidíxico, y que en general las sustituciones en *gyrA* surgen primero que las sustituciones en *parC* (Ling, 2003), se realizó una nueva búsqueda de sustituciones incluyendo aquellas que no se encontraban en la base de datos de PointFinder tales como D87Y, S83Y, S83F y D87G (Chen et.al., 2013; Mała et.al., 2018), sin embargo, ninguna de estas fue detectada en la secuencia de GyrA de 25TBS. Adicionalmente esta secuencia se alineó con su correspondiente en la cepa de tipo salvaje *S. Typhimurium* NCTC 74 (acceso Genbank WP_001281274.1) (Eaves et.al., 2002) usando el programa Clustal Omega. El porcentaje de similitud obtenido fue de 99.88%, encontrándose la sustitución D759E, no obstante, esta sustitución no se encuentra en la región determinante de resistencia a quinolona y no ha sido descrita como una sustitución asociada con la resistencia a este antibiótico, por lo cual serían necesarios estudios experimentales para conocer la implicación de la misma en el perfil de sensibilidad del aislamiento frente a las quinolonas.

⁵ Los resultados del perfil de sensibilidad fenotípico hacen parte del Proyecto “Determinación de genes de virulencia y resistencia a quinolonas en aislamiento de *Salmonella* spp. de alimentos de origen animal”, código 110274455994

Respecto a la resistencia a aminoglucósidos, todos los programas utilizados para la búsqueda de determinantes de resistencia reportaron el gen *aac(6')-Iaa* (también llamado *aac (6')-Iy*), el cual codifica para una enzima que acetila aminoglucósidos como tobramicina, kanamicina y amikacina, inactivando la acción de estos antibióticos (J. Liao et.al., 2019). De acuerdo al perfil de sensibilidad fenotípico la cepa 25TBS es sensible a tobramicina (19 mm) y amikacina (21 mm), y la kanamicina no fue evaluada.

La no concordancia entre los resultados genotípicos y fenotípicos en el perfil de sensibilidad a aminoglucósidos podría explicarse por el hecho de que *aac (6')-Iy* es un gen críptico o silencioso. Este tipo de genes están presentes en bacterias fenotípicamente sensibles a los antibióticos y han sido previamente descritos en *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter freundii* y *Salmonella enterica* (Magnet et.al., 1999; Salipante & Hall, 2003). En el caso particular de *aac (6')-Iy* parece ser un gen endógeno y específico para el género *Salmonella*, que fue detectado en un aislamiento de *S. Enteritidis* sensible a aminoglucósidos, en el cual el gen se expresa débilmente o no se expresa (Magnet et.al., 1999). La resistencia a aminoglucósidos conferida por el gen *aac (6')-Iy* en cepas de *Salmonella enterica* se debe a una fusión transcripcional secundaria a una delección cromosomal en la cual este gen queda bajo el control del promotor del gen *nmpC* (Magnet et.al., 1999; Salipante & Hall, 2003).

De igual modo se identificó el gen *ampH* mediante el programa RGI. AmpH ha sido clasificada como una proteína de unión a penicilina (PBP) por su capacidad de unión a la penicilina y sus derivados, y también se ha definido como una proteína estrechamente relacionada con las β -lactamasas de tipo C como AmpC por similitudes en su secuencia, aunque AmpC presenta una marcada actividad β -lactamasa hacia la nitrocefina mientras que AmpH tiene una baja actividad frente a este sustrato (González-Leiza et al., 2011; Henderson et al., 1997).

Además de los determinantes de resistencia anteriormente mencionados, en la cepa 25TBS se encontraron sustituciones en las proteínas transportadoras UhpT (E448K) y GlpT (E350Q), las cuales representan una vía de internalización de la fosfomicina en la célula. Estas sustituciones pueden alterar la afinidad por este antibiótico y reducir su captación, por lo cual han sido asociadas con la resistencia al mismo (Jaén-Luchoro et al., 2020; Mendes et al., 2016). Esta reducción en la permeabilidad es el principal mecanismo para la adquisición de resistencia a fosfomicina en aislamientos de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Castañeda-García et.al., 2013; Díez M & Cantón R, 2019). Así mismo, estas sustituciones han sido descritas en aislamientos de *S. Heidelberg* resistentes a fosfomicina (Rehman et.al., 2019).

De igual modo, mediante el programa RGI se identificó la sustitución R234F en el factor de elongación Tu. De acuerdo a la información encontrada en CARD, las variaciones en la secuencia de este factor de elongación confieren resistencia a Pulvomycin. En la literatura, esta sustitución ha sido descrita como un determinante de resistencia a ofloxacina en *K. pneumoniae* MDR aislada de pacientes y de agua de río, y en un aislamiento de *Aeromonas veronii* MDR obtenido de un paciente con septicemia (Hatrongjit et.al., 2020; Lepuschitz et.al., 2019; Rocha et.al., 2022), sin embargo, no se encontraron reportes de esta sustitución en aislamientos de *Salmonella* spp. Con todo lo anterior se recomienda evaluar fenotípicamente la sensibilidad de este aislamiento frente a aquellos antibióticos para los que se encontraron genes de resistencia y que no han sido evaluados previamente, con el fin de establecer la correlación fenotipo-genotipo.

Finalmente, mediante el programa RGI y las bases de datos de CARD y MEGARes de ABRicate, se identificaron genes codificadores de bombas de eflujo de múltiples fármacos, las cuales permiten la expulsión extracelular de un amplio rango de antibióticos y compuestos tóxicos (Song et al., 2015). Se encontraron sistemas de eflujo pertenecientes a la familia de resistencia a

nodulación-división celular (RND), familia de extrusión de compuestos tóxicos y multidroga (MATE), y superfamilia de facilitadores mayores (MFS) (Andersen et.al., 2015).

Dentro de las bombas de eflujo identificadas se encuentra el sistema MdsABC, cuya sobreproducción en aislamientos de *S. Typhimurium* confiere resistencia a variedad de compuestos tóxicos entre los que se encuentran novobiocina, acriflavina (Nishino, Latifi, et.al., 2006), cloranfenicol, tiamfenicol y betalactámicos (CARD). Con respecto al sistema AcrAB, se ha demostrado que en aislamientos de *S. Typhimurium* la resistencia a quinolonas, tetraciclina, cloranfenicol y betalactámicos parece ser altamente dependiente de la sobreexpresión de esta bomba de eflujo (Baucheron et.al., 2004; Giraud et.al., 2000).

De modo similar, Olubisose et al., 2021 reportaron la presencia de los genes *acrA*, *acrB* y *acrD* en diferentes serovariedades de *S. enterica* no tifoidea que mostraban un perfil de sensibilidad multirresistente, el cual podría estar relacionado con los genes identificados. De igual forma, estudios previos han demostrado que la delección del gen *acrD* en *S. Typhimurium* resultó en susceptibilidad hacia aminoglucósidos como amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y tobramicina (Cuesta et.al., 2021).

Así mismo fue identificado el activador transcripcional KdpE, el cual hace parte del sistema de dos componentes KdpD/KdpE, y ha sido reportado como gen de resistencia a aminoglucósidos en aislamientos MDR de *Citrobacter freundii* (Yap et.al., 2020), sin embargo, no se encontraron reportes de *kdpE* asociado con resistencia en *Salmonella*. Adicionalmente se encontraron genes codificadores de la bomba de eflujo de múltiples fármacos MdtABC junto con el sistema regulador BaeSR. En aislamientos de *S. Typhimurium* se ha descrito que la sobreproducción de MdtABC dada por el regulador de respuesta BaeR confiere resistencia a novobiocina y deoxicolato (Nagakubo et.al., 2002; Nishino et.al., 2007). Sumado a los genes mencionados anteriormente, se

identificó el gen *emrB* que codifica para una translocasa de la bomba de eflujo EmrAB, cuyos sustratos incluyen ácido nalidíxico, novobiocina y deoxicolato de sodio, así como el gen *emrR* que actúa como regulador negativo de dicha bomba (Rensch et.al., 2014; Xiong et.al., 2000). Los resultados obtenidos en referencia a los determinantes de resistencia a colistina de la cepa 25TBS serán tratados posteriormente en conjunto con los resultados de la cepa 33TXLD.

Con relación a la búsqueda de plásmidos en la cepa 25TBS, se observa que ninguna de las dos primeras estrategias utilizadas, clasificación de *contigs* plasmídicos y análisis de variación de profundidad, permitió identificar plásmidos. Por el contrario, la base de datos PLSDB mostró la presencia del plásmido pSE81-1705-3. Este plásmido fue reportado por Tadesse et.al., 2018 en un aislamiento de *Salmonella enterica* ser. Enteritidis cepa 81-1705 recuperado de casos clínicos humanos entre 1949 y 1995.

El plásmido pSE81-1705-3 tiene una longitud de 33784 pb y también ha sido descrito en *S. Typhimurium* fagotipo DT104 y DT104b, así como en *S. Dublin* aislada de queso y filtrado de leche (Mohammed et al., 2019; Mohammed & Orzechowska, 2021). Además de los reportes anteriormente mencionados, la búsqueda en la literatura no arrojó estudios en los cuales se caracterice este plásmido. Sin embargo, su anotación se encuentra disponible y el análisis de la misma no evidenció la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

Al igual que *S. Newport*, *S. Infantis* se encuentra entre las serovariedades más frecuentemente aisladas en casos de salmonelosis en todo el mundo (Bogomazova et al., 2020; Ranjbar et.al., 2018). Esta serovariedad ha sido aislada de humanos, animales y alimentos, entre otros; siendo más prevalente en aves de corral que en otros animales (Ranjbar et.al., 2018). Cabe destacar que la emergencia de *S. Infantis* se ha reportado en muchos países del mundo, como Alemania, Francia, Bélgica, Hungría, Rusia, Honduras, Japón y Australia, lo que indica que es una

serovariedad emergente a nivel mundial y una de las principales fuentes de infección de aves de corral y salmonelosis humana (Cohen et.al., 2020). En Latinoamérica, *S. Infantis* hace parte de las cuatro serovariedades aisladas con mayor frecuencia a partir de carne y menudencias de pollo en Chile, Brasil, Ecuador, México y Argentina (Guerrero et.al., 2022).

Así mismo, existe una creciente preocupación por la propagación de clones de *S. Infantis* resistentes a múltiples antibióticos en todo el mundo (Gymoese et.al., 2019) (Ranjbar *et.al.*, 2018). Diversos estudios han descrito la emergencia de clones MDR de esta serovariedad asociados a pollo y la mayoría de estos clones pertenecen al secuenciotipo 32, al cual fue asignado la cepa 33TXLD (Alba et.al., 2020; Bogomazova et.al., 2020; A. Brown et.al., 2018; Cohen et.al., 2020; Franco et.al., 2015; Hindermann et.al., 2017; Kürekci et.al., 2021; Mejía et.al., 2020; Tate et.al., 2017).

En este estudio la cepa *Salmonella enterica* ser. *Infantis* 33TXLD presentó un patrón de resistencia que incluye la resistencia a los grupos de antibióticos descritos para la cepa 25TBS y adicionalmente determinantes que pueden conferir resistencia a betalactámicos de amplio espectro, diaminopirimidinas, fenicoles, sulfonamidas, tetraciclinas y nitrofuranos. Este patrón de resistencia es similar al reportado en clones emergentes de *S. Infantis* MDR descritos en los últimos años en múltiples países del mundo (Aviv, 2014; Cohen et.al., 2020; Soto, 2020, Tate *et.al.*, 2017). Es importante resaltar que la cepa 33TXLD presenta un mayor número de determinantes de resistencia, entre los que se destacan las sustituciones asociadas con la resistencia a colistina, la sustitución en *parC* y el gen de resistencia a fosfomicina mediado por plásmido, *fosA3*, los cuales no se encuentran en los aislamientos emergentes de *S. Infantis* MDR descritos en la literatura. En el Apéndice Q se observan los genes y sustituciones asociadas con resistencia a los antimicrobianos detectados en la cepa de estudio y en cepas de *S. Infantis* previamente reportadas. Cabe mencionar

que el gen *fosA3* si se ha reportado en otros aislamientos de *S. Infantis* emergentes, pero no en las cepas usadas en la comparación.

Cabe resaltar que para la cepa 33TXLD los programas PointFinder y RGI reportaron sustituciones puntuales tanto en *gyrA* como en *parC*, las cuales son las principales sustituciones involucradas en la resistencia a quinolonas en *Salmonella* spp. (Hopkins *et.al.*, 2007; Qian *et.al.*, 2020). De acuerdo con los resultados de PointFinder las sustituciones detectadas confieren resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina, sin embargo, fenotípicamente la cepa 33TXLD solamente presenta resistencia a ácido nalidíxico, pero no a ciprofloxacina.

En cuanto a las bombas de eflujo, en la cepa 33TXLD se encontraron los mismos genes hallados en la cepa 25TBS, más sustituciones adicionales en los genes *marR*, *soxX* y *soxR*. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el programa RGI utiliza como referencia las secuencias de estos genes en *E. coli* K12, las cuales difieren de las secuencias correspondientes en el genoma de la cepa modelo para el estudio de *Salmonella*, *S. Typhimurium* LT2, por tanto, en este caso el reporte dado por RGI no es preciso, ya que es necesario que la comparación se realice con la secuencia de los genes *marR*, *soxX* y *soxR* de *Salmonella enterica*.

Teniendo en cuenta lo anterior, se buscó en la literatura reportes de sustituciones en *marR*, *soxS* y *soxR* en *Salmonella*, para evaluar si estaban presentes en la cepa 33TXLD. En el caso de *marR* no se encontró información acerca de sustituciones en aislamientos de *Salmonella*, en cambio, para *soxR* se ha descrito que la sustitución R20H contribuye en la resistencia a ácido nalidíxico y la sensibilidad disminuida a ciprofloxacina en aislamientos de *S. Enteritidis* (O'Regan *et.al.*, 2009), así mismo se reporta que la sustitución G121D confiere resistencia a quinolonas en la cepa *S. Typhimurium* St46 (Koutsolioutsou *et.al.*, 2001). Respecto al gen *soxS*, se ha descrito que la mutación E52K en aislamientos de *S. Enteritidis* está asociada con resistencia a ácido

nalidíxico y sensibilidad disminuida a ciprofloxacina (O'Regan et.al., 2009). Al realizar los alineamientos de las secuencias de *soxR* y *soxS* de la cepa 33TXLD y las secuencias correspondientes utilizadas como referencia para la identificación de las sustituciones anteriormente mencionadas (*S. Typhimurium* St45, *S. Typhimurium* ATCC 14028 y *S. Enteritidis* PT4 NCTC 13349), se evidencia que no se presentan dichas sustituciones en la cepa de estudio.

Por otra parte, respecto a la resistencia a colistina mediante modificación del LPS, cabe resaltar que se encontraron los mismos genes y sustituciones asociadas a esta resistencia en los dos aislamientos de estudio, a excepción de diferencias en las sustituciones encontradas en la proteína PmrC. Estos hallazgos serán discutidos a continuación.

La base de datos MEGARes de ABRicate reportó el gen *pmrG* el cual codifica la fosfatasa PmrG que cataliza la desfosforilación de la heptosa (II) del *core* del LPS. Esta enzima es necesaria para la resistencia a Fe (III) y podría estar asociada con la resistencia a polimixinas debido a la disminución de la carga negativa del LPS causada por la desfosforilación (Farizano et.al., 2012; Nishino, Hsu, et.al., 2006); sin embargo, también se han reportado estudios que indican que la pérdida del gen *pmrG* no causa efecto en la resistencia a polimixinas (H. D. Chen & Groisman, 2013; Gunn et.al., 2000).

Con respecto a la anotación realizada con Prokka en esta se reportaron los genes que conforman los operones encargados de la síntesis y modificación del lípido A en bacterias Gram negativas, como lo son *arnBCADTEF-pmrE* (también nombrado *pmrHFIJKLM-pmrE*) y *pmrCAB*, así como las proteínas reguladoras de dichos operones y que conforman los sistemas reguladores de dos componentes PhoP/Q y PmrA/B (Tabla 14). La activación de estos sistemas lleva a la regulación positiva del operón *pmrCAB*, que media la síntesis y transferencia de PetN, y del operón *arnBCADTEF-pmrE*, que media la síntesis y transferencia de L-Ara4N, al lípido A (Aghapaur,

Sekyere 2016). Del mismo modo, fueron anotadas otras proteínas involucradas en las modificaciones del LPS tales como EptC y EptB, que adicionan PetN al *core* del LPS, PagL responsable de la deacilación del lípido A, LpxO encargado de la hidroxilación del mismo, PmrR que reprime la fosforilación del lípido A y PmrD, la cual media la interacción entre PhoP/Q y PmrA/B (Tabla 14) (Gunn et.al., 2000; Kato et.al., 2012; Mlynarcik & Kolar, 2019; Olaitan et.al., 2014).

Sumado a lo anterior, en este estudio se identificaron sustituciones no sinónimas en las proteínas PmrA, PmrB, PhoP, PhoQ, PmrC y PmrD las cuales han sido previamente asociadas con la resistencia a colistina (Ricci et.al., 2020; Wang et.al., 2018), así como sustituciones nuevas en la proteína PmrC (F59L, A193S, D366N, K445R, E415Q, V161I, R263L), para las cuales no se encontró reporte en la literatura (Figura 6 y 7). Estas alteraciones podrían llevar a la activación constitutiva de los TCS PmrA/B y PhoP/Q y a la sobreexpresión de los genes modificadores del LPS (operón *arnBCADTEF*, *pmrC*, *pmrE*, *eptC*, *eptB*, *pagL* y *lpxO*), lo que disminuye la carga negativa del LPS, reduce la unión de la colistina y lleva a la resistencia (Aghapour et.al., 2019; Olaitan et.al., 2014; Poirel et.al., 2017; Spector & Kenyon, 2012).

El primer reporte de este tipo de sustituciones en el género *Salmonella* fue realizado por Roland et al., 1993, quienes encontraron que la sustitución R81H en la proteína PmrA (*pmrA505*) incrementaba la resistencia a polimixina B en aislamientos de *S. Typhimurium* LT2, a través del incremento de la expresión de los genes regulados por esta proteína. Posteriormente Gunn et.al., 2000, demostraron que el operón *pmrCAB* está regulado por PhoP/Q y, por tanto, sustituciones en este sistema de dos componentes afectan el fenotipo de resistencia a polimixina dado por la sobreexpresión de PmrA/B.

Por su parte Sun et al., 2009, identificaron 27 diferentes sustituciones puntuales no sinónimas en las proteínas PmrA y PmrB que confieren resistencia a colistina, también en aislamientos de *S. Typhimurium* LT2. Desde entonces diversos estudios han reportado sustituciones en los TCS de aislamientos de *Salmonella enterica* que están involucradas en la resistencia a colistina (Anjum et.al., 2017; Antunes et.al., 2016; Elbediwi et.al., 2020; Jovčić et.al., 2020; Olaitan et.al., 2015). En la mayoría de los estudios previamente mencionados las sustituciones asociadas con la resistencia a colistina fueron identificadas usando como referencia el genoma de *S. Typhimurium* LT2. Esta es la cepa principal empleada en los estudios de biología celular y molecular del género *Salmonella* y es sensible a los antimicrobianos incluyendo la colistina (Herrero et.al., 2006; McClelland et.al., 2001). Sin embargo, en ninguno de los aislamientos de estudio se identificaron las sustituciones que han sido reportadas utilizando como referencia esta cepa.

No obstante, se encontraron las sustituciones descritas por Wang et.al., 2018 en las proteínas PmrA, PmrB, PhoP, PhoQ, PmrC y PmrD utilizando como cepa de referencia *S. Typhi* CT18. Estas sustituciones fueron encontradas en una cepa de *S. Typhimurium* WW012 resistente a colistina, aislada de muestras de cerdo listo para consumo en China. Cabe resaltar que *S. Typhi* CT18 fue el primer genoma de *Salmonella enterica* ser. Typhi en ser completado y se considera una de las cepas de referencia para discriminar aislamientos de *Salmonella enterica* (Kruy et.al., 2011). Así mismo ha sido utilizada como genoma de referencia para el análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (Engsbro et.al., 2019). *S. Typhi* CT18 es resistente a múltiples antibióticos, pero es sensible a colistina (Argimón, 2021; Lu, 2017; Parkhill, 2001). Se resalta la identificación de siete sustituciones adicionales en PmrC que no fueron reportadas por Wang et al., 2018 y en nuestro conocimiento no han sido descritas hasta el momento.

Las sustituciones identificadas en los sistemas PmrA/B y PhoP/Q, así como en las proteínas PmrC y PmrD, y la posible sobreexpresión de proteínas modificadoras del LPS tales como PmrC, ArnB, ArnC, ArnA, ArnD, ArnT, PmrE, EptC, EptB, PagL y LpxO, podrían ser las responsables del fenotipo de resistencia a colistina observado en los aislamientos de estudio. No obstante, debido a que estas sustituciones fueron identificadas usando como referencia una cepa diferente a *S. Typhimurium* LT2, y teniendo en cuenta que los resultados obtenidos del análisis genómico son una predicción del mecanismo de resistencia a colistina presente en los aislamientos de estudio, sería necesario realizar estudios adicionales que permitan confirmar el mecanismo cromosomal encontrado en las cepas.

Dentro de estos análisis se encuentran los ensayos de complementación para determinar si las sustituciones identificadas son las que están confiriendo la resistencia a colistina, así como análisis transcriptómico para evaluar el nivel de expresión de los sistemas PhoP/Q y PmrA/B, y de los genes modificadores del LPS. Sumado a esto, se puede usar la espectrometría de masas MALDI-TOF con el fin de analizar la estructura química del lípido A e identificar los motivos de PetN y/o L-Ara4N asociados con la resistencia a colistina de tipo cromosomal.

El análisis de los dominios proteicos similares a los que forman la proteína MCR permitió identificar los dominios de las proteínas EptA y EptB en las dos cepas de estudio. La enzima EptA (PmrC) es una transferasa necesaria para la modificación del lípido A con fosfoetanolamina (Samantha & Vrielink, 2020). Esta modificación reduce la carga neta negativa general de la membrana externa de algunas bacterias Gram negativas entre las que se encuentra *Salmonella enterica*, lo que confiere resistencia a las polimixinas (Samantha & Vrielink, 2020; Yu et.al., 2015). Por su parte, aunque EptB también es una transferasa de fosfoetanolamina, esta se encarga de la modificación del residuo Kdo del LPS. Al igual que la modificación del lípido A, la adición

de fosfoetanolamina al Kdo reduce la carga aniónica del LPS conduciendo eventualmente a la resistencia a polimixinas (Moon & Gottesman, 2009). La modificación con fosfoetanolamina es una de las modificaciones del LPS más comunes asociadas con el aumento de la CIM de colistina en bacterias Gram negativas como *Salmonella* spp. (Fortini et.al., 2022).

La comparación de la arquitectura de los dominios de las transferasas de fosfoetanolamina entre las cepas de estudio y las de referencia evidencia que el dominio sulfatasa (dominio catalítico soluble) es más conservado que el dominio transmembranal (Tabla 16), lo que coincide con lo reportado en la literatura para estas enzimas (Fage et.al., 2014; Samantha & Vrielink, 2020). Finalmente, aunque MCR, EptA y EptB catalizan la adición de fosfoetanolamina al LPS y son homólogos estructurales (Son et.al., 2019), la proteína MCR es codificada en un plásmido y comparte menos del 31% de identidad con las proteínas identificadas en las cepas de estudio, independientemente del perfil de sensibilidad y la serovariedad de las cepas de comparación, mientras que, de acuerdo a los alineamientos realizados, las proteínas identificadas en la cepa 25TBS y 33TXLD tienen identidades mayores al 99% con las transferasas de fosfoetanolamina codificadas cromosomalmente. Lo anterior confirma que los aislamientos de estudio no presentan proteínas MCR y que las transferasas de fosfoetanolamina detectadas son de tipo cromosomal.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la búsqueda de plásmidos, la estrategia que permitió la detección de los mismos en los dos aislamientos fue la búsqueda mediante la base de datos PLSDB. Así mismo, el análisis de los *misassemblies* reportados por QUAST permitió la detección del megaplásmido en la cepa 33TXLD. El análisis de las regiones de no alineamiento identificadas en los *contigs* con *misassemblies* permitió la identificación de un megaplásmido de tipo pESI en la cepa 33TXLD (p33TXLD). Este plásmido posee las características típicas de resistencia, virulencia, y *fitness* descritas en este tipo de megaplásmidos, tales como el pESI119944

detectado en un clon emergente de *S. Infantis* en Israel, el megaplásmido pN55391 encontrado en *S. Infantis* aislada de pollo crudo y pESI2747 detectado en *S. Infantis* de pollos de granja. Además, se identificaron varios elementos móviles comunes a los que presentan los plásmidos de tipo pESI, y se determinó la naturaleza quimérica de este megaplásmido, evidenciada por la presencia de un perfil alélico de tipo IncI y un *oriV* de un grupo IncP1- α , lo cual indica que los plásmidos pESI probablemente evolucionaron de la recombinación entre al menos dos plásmidos ancestrales diferentes. (Aviv et.al., 2014; García-Soto et.al., 2020; Tate et.al., 2017).

De igual manera, los altos porcentajes de alineamiento obtenidos en la determinación de proteínas del sistema conjugativo demuestran la presencia de la mayoría (54 de 66 proteínas) de proteínas que conforman las regiones de transferencia, líder y de replicación de plásmidos de tipo pESI. Lo anterior sugiere que el plásmido p33TXLD tiene la capacidad de conjugarse, lo que concuerda con lo reportado para el pESI119944, en el cual se demostró experimentalmente la capacidad de autoconjugación (Aviv et.al., 2014b; Tate et.al., 2017). Adicionalmente, la detección de las proteínas de conjugación coincide con lo descrito por (Bogomazova et.al., 2020) quienes detectaron los genes responsables del mantenimiento y transferencia conjugativa en este tipo de plásmidos. No obstante, es importante mencionar que para confirmar la capacidad conjugativa del plásmido p33TXLD esta debe ser evaluada experimentalmente.

Como se mencionó anteriormente, en varios países del mundo se ha reportado un preocupante incremento en la incidencia de *S. Infantis* aislada de alimentos como la carne de pollo, animalesZ como las aves de corral y de infecciones en humanos (Bouckaert et.al., 2014; Gal-Mor et.al., 2010; Hindermann et.al., 2017; Kürekci et.al., 2021). Diversos estudios plantean que la rápida y exitosa diseminación de este clon emergente se debe a la presencia del megaplásmido pESI, el cual confiere a la bacteria nuevas propiedades de resistencia a antibióticos y metales

pesados, así como mayor capacidad de colonización, virulencia y *fitness*, lo que mejora significativamente la patogenicidad de los aislamientos, ofreciendo ventajas en el medio ambiente y el hospedero (Aviv et.al., 2014; García-Soto et.al., 2020; Kürekci et.al., 2021). Cabe destacar que se han reportado aislamientos de *S. Infantis* portadores de pESI resistentes a antibióticos altamente relevantes como las cefalosporinas y la colistina (Kürekci et.al., 2021), al igual que lo encontrado en el aislamiento de estudio.

S. Infantis portadora de pESI ha sido reportada en diferentes países como Israel, Alemania, Reino Unido, Hungría, Italia, EE.UU., Perú, Ecuador, entre otros; siendo ST32 el secuenciotipo dominante en aislamientos de numerosas fuentes encontrándose con mayor frecuencia en aves de corral y sus productos derivados como la carne de pollo (Franco et.al., 2015; García-Soto et.al., 2020; Mejía et.al., 2020). Además de Perú y Ecuador, no se encontró información de aislamientos portadores de plásmidos pESI en otros países de sur América, por tanto, en nuestro conocimiento este es el primer reporte de un megaplásmido pESI en *Salmonella* aislada de pollo en Colombia.

Adicionalmente, el aumento en la incidencia y la diseminación de estos clones de *S. Infantis* MDR en las poblaciones de pollos de engorde ha llevado a la propagación de dichos aislamientos en la cadena alimentaria y a través de los productos avícolas a los seres humanos (García-Soto et.al., 2020), lo que representa un problema potencial de salud pública.

Teniendo en cuenta que en la selección realizada con plasmidVerify y viralVerify, 10 de los 12 *contigs* clasificados como plasmídicos hacen parte del megaplásmido p33TXLD, se sugiere que en el caso del aislamiento 33TXLD el análisis mediante estas dos herramientas si resulta útil en la búsqueda de posibles plásmidos. Mediante el programa PLSD se encontraron tres plásmidos en la cepa 33TXLD. A partir del alineamiento realizado se observa que los plásmidos pSA20051401.5 y pSE81-1705-3 alinean en su totalidad con regiones del *contig* 1. Para el

plásmido pSA20051401.5 solo se encontró un reporte realizado por Bessonov et al., 2018 en *S. Mikawasima* aislada de un paciente. En cuanto a pSE81-1705-3, es el mismo plásmido identificado en la cepa 25TBS, sobre el cual ya se discutió previamente. Por su parte, pCFSAN003307 alinea con múltiples *contigs* (26 de los 60 *contigs*), lo que sugiere que la cepa 33TXLD tiene fragmentos similares a los que forman el pCFSAN003307, pero no el plásmido como tal. Este plásmido es descrito como un megaplásmido (178238 pb) de *S. Infantis* por Cohen et al., 2020, quienes compararon la secuencia de pESI119944 con secuencias de otros megaplásmidos de *S. Infantis* entre los que se encontraba pCFSAN003307.

La detección de otros plásmidos en cepas de *S. Infantis* portadoras del megaplásmido pESI ha sido descrita por Kürekcı et al., 2021, quienes encontraron en tres de estas cepas un plásmido IncX1 y en otra un plásmido IncI1e.

7. Conclusiones

La secuenciación del genoma completo de los aislamientos de estudio permitió la caracterización del aislamiento 25TBS como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Newport ST2370, el cual presenta un perfil genotípico de multirresistencia, así como el plásmido no conjugativo, pSE81-1705-3. Por su parte, el aislamiento 33TXLD fue identificado como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Infantis* ST32, el cual presentó un perfil genotípico de resistencia aún más amplio que el aislamiento 25TBS, y en el que se detectó un megaplásmido de tipo pESI con potencial conjugativo, y los plásmidos pSA20051401.5 y pSE81-1705-3.

Respecto a los determinantes de resistencia a colistina, en ninguno de los dos aislamientos se identificaron variantes del gen *mcr*, en cambio, se detectaron sustituciones y genes involucrados

en la modificación del LPS y la posterior resistencia a colistina; así como los dominios de las proteínas de codificación cromosomal EptA y EptB. Lo anterior evidencia la presencia de un mecanismo de resistencia a colistina de origen cromosomal.

En nuestro conocimiento este es el primer reporte de los secuenciotipos 2370 y 32, así como del megaplásmido de tipo pESI en *Salmonella* aislada de pollo en Colombia. De modo similar, no se encontraron reportes en la literatura y no se conoce el efecto en la resistencia a colistina de las sustituciones F59L, A193S, D366N, K445R, E415Q, V161I y R263L identificadas en la proteína PmrC de la cepa 33TXLD.

La mayor calidad del ensamblaje obtenido con Unicycler, las diferencias en los determinantes de resistencia predichos con los diversos *softwares* y la identificación de plásmidos mediante sólo una de las estrategias utilizadas para tal fin, evidencian la importancia del uso de diversas herramientas bioinformáticas en el estudio de los datos obtenidos de la WGS, debido a que permite un análisis genómico más completo y resultados más precisos y confiables.

Referencias Bibliográficas

- Achtman, M., Zhou, Z., Alikhan, N.-F., Tyne, W., Parkhill, J., Cormican, M., Chiou, C.-S., Torpdahl, M., Litrup, E., Prendergast, D. M., Moore, J. E., Strain, S., Kornschöber, C., Meinersmann, R., Uesbeck, A., Weill, F.-X., Coffey, A., Andrews-Polymenis, H., Curtiss, R., & Fanning, S. (2020). Genomic diversity of *Salmonella enterica* -The UoWUCC 10K genomes project. *Wellcome Open Research*, 5, 223. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16291.1>
- Aghapour, Z., Gholizadeh, P., Ganbarov, K., Bialvaei, A. Z., Mahmood, S. S., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2019). Molecular mechanisms related to colistin resistance in enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*, 12, 965–975. <https://doi.org/10.2147/IDR.S199844>
- Alba, P., Leekitcharoenphon, P., Carfora, V., Amoruso, R., Cordaro, G., di Matteo, P., Ianzano, A., Iurescia, M., Diaconu, E. L., Pedersen, S. K., Guerra, B., Hendriksen, R. S., Franco, A., & Battisti, A. (2020). Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in europe: Insights into the success of the bacterial host and its parasitic pesi-like megaplasmid. *Microbial Genomics*, 6(5), 1–12. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000365>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. L. v., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>

- Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., & Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genetics*, 14(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>
- Al-Tawfiq, J. A., Laxminarayan, R., & Mendelson, M. (2017). How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International Journal of Infectious Diseases*, 54, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.415>
- Andersen, J. L., He, G. X., Kakarla, P., Ranjana, K. C., Kumar, S., Lakra, W. S., Mukherjee, M. M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T., & Varela, M. F. (2015). Multidrug efflux pumps from enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 12, Issue 2, pp. 1487–1547). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph120201487>
- Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiology Spectrum*, 5(6), 1–17. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0011-2017>
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2016). PlasmidSPAdes: Assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, 32(22), 3380–3387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493>
- Antipov, D., Raiko, M., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2019). Plasmid detection and assembly in genomic and metagenomic data sets. *Genome Research*, 29(6), 961–968. <https://doi.org/10.1101/gr.241299.118>
- Antipov, D., Raiko, M., Lapidus, A., & Pevzner, P. A. (2020). Metaviral SPAdes: Assembly of viruses from metagenomic data. *Bioinformatics*, 36(14), 4126–4129. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa490>

- Antonelli, P., Belluco, S., Mancin, M., Losasso, C., & Ricci, A. (2019). Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: A systematic review of the literature, 2013–2017. *Research in Veterinary Science*, 126(April), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.022>
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., & Peixe, L. (2016). Salmonellosis: The role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>
- Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., & Nwobi, O. C. (2020). Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031028>
- Aviv, G., Tsyba, K., Steck, N., Salmon-Divon, M., Cornelius, A., Rahav, G., Grassl, G. A., & Gal-Mor, O. (2014). A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environmental Microbiology*, 16(4), 977–994. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12351>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. v., Sirotkin, A. v., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bardet, L., & Rolain, J. M. (2018). Development of new tools to detect colistin-resistance among enterobacteriaceae strains. In *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/3095249>

- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., & Cloeckaert, A. (2004). AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3729–3735. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3729-3735.2004>
- Bessonov, K., Robertson, J. A., Lin, J. T., Liu, K., Gurnik, S., Kernaghan, S. A., Yoshida, C., & Nash, J. H. E. (2018). *Complete Genome and Plasmid Sequences of 32 Salmonella enterica Strains from 30 Serovars*. <https://doi.org/10.1128/MRA>
- Boetzer, M., Henkel, C. v., Jansen, H. J., Butler, D., & Pirovano, W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*, 27(4), 578–579. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq683>
- Bogomazova, A. N., Gordeeva, V. D., Krylova, E. v., Soltynskaya, I. v., Davydova, E. E., Ivanova, O. E., & Komarov, A. A. (2020). Mega-plasmid found worldwide confers multiple antimicrobial resistance in *Salmonella* Infantis of broiler origin in Russia. *International Journal of Food Microbiology*, 319. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108497>
- Borowiak, M., Baumann, B., Fischer, J., Thomas, K., Deneke, C., Hammerl, J. A., Szabo, I., & Malorny, B. (2020). Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00080>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp.

- enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Bradnam, K. R., Fass, J. N., Alexandrov, A., Baranay, P., Bechner, M., Birol, I., Boisvert, S., Chapman, J. A., Chapuis, G., Chikhi, R., Chitsaz, H., Chou, W. C., Corbeil, J., Fabbro, C. del, Docking, R. R., Durbin, R., Earl, D., Emrich, S., Fedotov, P., ... Korf, I. F. (2013). Assemblathon 2: Evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *GigaScience*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2047-217X-2-10>
- Brown, A., Chen, J., Francois, L., Campbell, D., Folster, J., Tate, H., Wasilenko, J., van Tubbergen, C., & Friedman, C. (2018). CTX-M-65 Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Salmonella enterica* Serotype Infantis, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.3201/eid2412.180500>
- Brown, E. W., Bell, R., Zhang, G., Timme, R., Zheng, J., Hammack, T. S., & Allard, M. W. (n.d.). *Salmonella* Genomics in Public Health and Food Safety. DOMAIN 6 EVOLUTION AND GENOMICS. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., & Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 1–5. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>

- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Carrillo, C. D., Koziol, A., Vary, N., & Blais, B. W. (n.d.). *Applications of Genomics in Regulatory Food Safety Testing in Canada*. www.intechopen.com
- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldemann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). *enterica* Serotype Typhimurium Isolate. 10(3), 1–6.
- Cassir, N., Rolain, J. M., & Brouqui, P. (2014). A new strategy to fight antimicrobial resistance: The revival of old antibiotics. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00551>
- Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. In *Antibiotics* (Vol. 2, Issue 2, pp. 217–236). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>
- Chen, H. D., & Groisman, E. A. (2013). The biology of the PmrA/PmrB two-component system: The major regulator of lipopolysaccharide modifications. *Annual Review of Microbiology*, 67, 83–112. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155751>
- Chen, H. M., Wang, Y., Su, L. H., & Chiu, C. H. (2013). Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. In *Pediatrics and Neonatology* (Vol. 54, Issue 3, pp. 147–152). <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.01.010>
- Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D67–D72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>

- Coetzee, J., Corcoran, C., Prentice, E., Moodley, M., Mendelson, M., Poirel, L., Nordmann, P., & Brink, A. J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. *South African Medical Journal*, *106*(5), 449–450. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2016.v106i5.10710>
- Cohen, E., Rahav, G., Gal-Mor, O., & Ochman, H. (2020). Genome Sequence of an Emerging *Salmonella enterica* Serovar Infantis and Genomic Comparison with Other *S. Infantis* Strains. *Genome Biology and Evolution*, *12*(3), 223–228. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa048>
- Cooper, A. L., Low, A. J., Koziol, A. G., Thomas, M. C., Leclair, D., Tamber, S., Wong, A., Blais, B. W., & Carrillo, C. D. (2020). Systematic Evaluation of Whole Genome Sequence-Based Predictions of *Salmonella* Serotype and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *11*(April), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00549>
- Cortese, I. J., Castrillo, M. L., Onetto, A. L., Bich, G. Á., Zapata, P. D., & Laczeski, M. E. (2021). De novo genome assembly of *Bacillus altitudinis* 19RS3 and *Bacillus altitudinis* T5S-T4, two plant growth-promoting bacteria isolated from *Ilex paraguariensis* St. Hil. (yerba mate). *PLoS ONE*, *16*(3 March). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248274>
- Cuesta, J., El-Delik, J., Göttig, S., & Pos, K. M. (2021). Characterization and molecular determinants for β -lactam specificity of the multidrug efflux pump AcrD from *Salmonella* Typhimurium. *Antibiotics*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121494>
- Cuypers, W. L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E. J., Deborggraeve, S., & van Puyvelde, S. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: Insights by wholegenome sequencing. In *Microbial Genomics* (Vol. 4, Issue 7). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>

- da Cunha, B. R., Fonseca, L. P., & Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 8(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020045>
- Desai, A., Marwah, V. S., Yadav, A., Jha, V., Dhaygude, K., Bangar, U., Kulkarni, V., & Jere, A. (2013). Identification of Optimum Sequencing Depth Especially for De Novo Genome Assembly of Small Genomes Using Next Generation Sequencing Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060204>
- Diez M, & Cantón R. (2019). New microbiological aspects of fosfomycin. *Rev Esp Quimioter*, 32(1), 8–18. www.seq.es
- Doster, E., Lakin, S. M., Dean, C. J., Wolfe, C., Young, J. G., Boucher, C., Belk, K. E., Noyes, N. R., & Morley, P. S. (2020). MEGARes 2.0: A database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D561–D569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1010>
- Doumith, M., Godbole, G., Ashton, P., Larkin, L., Dallman, T., Day, M., Day, M., Muller-Pebody, B., Ellington, M. J., de Pinna, E., Johnson, A. P., Hopkins, K. L., & Woodford, N. (2016). Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2300–2305. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw093>
- Duval, R. E., Grare, M., & Demoré, B. (2019). Fight against antimicrobial resistance: We always need new antibacterials but for right bacteria. *Molecules*, 24(17), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules24173152>
- Eaves, D. J., Liebana, E., Woodward, M. J., & Piddock, L. J. V. (2002). Detection of gyrA mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* by denaturing high-performance

- liquid chromatography. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 4121–4125.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4121-4125.2002>
- Elbediwi, M., Pan, H., Biswas, S., Li, Y., & Yue, M. (2020). Emerging colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Newport isolates from human infections. In *Emerging Microbes and Infections* (Vol. 9, Issue 1, pp. 535–538). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1733439>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G., & Lee, L. H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- Engsbro, A. L., Jespersen, H. S. R., Goldschmidt, M. I., Mollerup, S., Worning, P., Pedersen, M. S., Westh, H., & Schneider, U. V. (2019). Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi in a pregnant traveller returning from Karachi, Pakistan to Denmark, 2019. *Eurosurveillance*, 24(21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.21.1900289>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2016). *Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae Improved laboratory methods for colistin resistance and June*.
- European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- Fage, C. D., Brown, D. B., Boll, J. M., Keatinge-Clay, A. T., & Trent, M. S. (2014). Crystallographic study of the phosphoethanolamine transferase EptC required for polymyxin resistance and motility in *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica*

- Section D: *Biological Crystallography*, 70(10), 2730–2739.
<https://doi.org/10.1107/S1399004714017623>
- Fardsanei, F., Soltan Dallal, M. M., Douraghi, M., Zahraei Salehi, T., Mahmoodi, M., Memariani, H., & Nikkhahi, F. (2017). Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. *Microbial Pathogenesis*, 107, 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.026>
- Farizano, J. v., Pescaretti, M. D. L. M., López, F. E., Hsu, F. F., & Delgado, M. A. (2012). The PmrAB system-inducing conditions control both lipid A remodeling and O-antigen length distribution, influencing the *Salmonella typhimurium*-host interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38778–38789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397414>
- Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C. H., McDermott, P. F., Tadesse, D. A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J. P., & Klimke, W. (2019). Validating the AMRFINDER tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>
- Ferrari, R. G., Panzenhagen, P. H. N., & Conte-Junior, C. A. (2017). Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella Typhimurium* source tracking. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02587>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), & WHO. (2016). Interventions for the Control of Non-typhoidal *Salmonella* spp. in Beef and Pork. MEETING REPORT AND SYSTEMATIC REVIEW. *Meeting Report and Systematic Review. Microbiological Risk Assessment Series No. 30*. www.fao.org/food/food-safety-quality

- Fortini, D., Owczarek, S., Dionisi, A. M., Lucarelli, C., Arena, S., Carattoli, A., Villa, L., García-Fernández, A., Helfer, F., Aschbacher, R., Cozza, D., de Marchis, M., Pitti, M., Ortenzi, R., Napoleoni, M., & Corbella, M. (2022). Colistin Resistance Mechanisms in Human *Salmonella enterica* Strains Isolated by the National Surveillance Enter-Net Italia (2016–2018). *Antibiotics*, *11*(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010102>
- Franco, A., Leekitcharoenphon, P., Feltrin, F., Alba, P., Cordaro, G., Iurescia, M., Tolli, R., D’Incau, M., Staffolani, M., di Giannatale, E., Hendriksen, R. S., & Battisti, A. (2015). Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* Infantis Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS ONE*, *10*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144802>
- Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., & Keller, A. (2019). PLSDB: A resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D195–D202. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1050>
- Gal-Mor, O., Valinsky, L., Weinberger, M., Guy, S., Jaffe, J., Schorr, Y. I., Raisfeld, A., Agmon, V., & Nissan, I. (2010). Multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar infantis, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(11), 1754–1757. <https://doi.org/10.3201/eid1611.100100>
- Garcia-Graells, C., de Keersmaecker, S. C. J., Vanneste, K., Pochet, B., Vermeersch, K., Roosens, N., Dierick, K., & Botteldoorn, N. (2018). Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, *mcr-1* and *mcr-2* Genes, in *Salmonella* spp. Isolated from Food at Retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(2), 114–117. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2329>

- García-Soto, S., Abdel-Glil, M. Y., Tomaso, H., Linde, J., & Methner, U. (2020). Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Subspecies *enterica* Serovar *Infantis* of Multilocus Sequence Type 2283 in German Broiler Farms. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01741>
- Giraud, E., Cloeckaert, A., Kerboeuf, D., & Chaslus-Dancla, E. (2000). Evidence for Active Efflux as the Primary Mechanism of Resistance to Ciprofloxacin in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. In *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* (Vol. 44, Issue 5).
- Giske, C. G. (2015). Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 21, Issue 10, pp. 899–905). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.022>
- Gogry, F. A., Siddiqui, M. T., Sultan, I., & Haq, Q. M. R. (2021). Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.677720>
- Guerrero, T., Bayas-Rea, R., Erazo, E., & Zapata Mena, S. (2022). Nontyphoidal *Salmonella* in Food from Latin America: A Systematic Review. In *Foodborne Pathogens and Disease* (Vol. 19, Issue 2, pp. 85–103). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2925>
- Gunn, J. S., Ryan, S. S., van Velkinburgh, J. C., Ernst, R. K., & Miller, S. I. (2000). Genetic and Functional Analysis of a PmrA-PmrB-Regulated Locus Necessary for Lipopolysaccharide Modification, Antimicrobial Peptide Resistance, and Oral Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 68, Issue 11).

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gymoese, P., Kiil, K., Torpdahl, M., Østerlund, M. T., Sørensen, G., Olsen, J. E., Nielsen, E. M., & Litrup, E. (2019). WGS based study of the population structure of *Salmonella enterica* serovar Infantis. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6260-6>
- Hatrongjit, R., Kerdsin, A., Takeuchi, D., Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Chopjitt, P., Boueroy, P., Akeda, Y., & Hamada, S. (2020). Genomic analysis of *Aeromonas veronii* C198, a novel Mcr-3.41-harboring isolate from a patient with septicemia in Thailand. *Pathogens*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121031>
- Henderson, T., Young, K., Denome, S., & Elf, P. (1997). AmpC and AmpH, Proteins Related to the Class C β -Lactamases, Bind Penicillin and Contribute to the Normal Morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6112–6121.
- Herrero, A., Rodicio, M. R., González-Hevia, M. A., & Mendoza, M. C. (2006). Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(1), 39–45. <https://doi.org/10.1093/jac/dki400>
- Hindermann, D., Gopinath, G., Chase, H., Negrete, F., Althaus, D., Zurfluh, K., Tall, B. D., Stephan, R., & Nüesch-Inderbinen, M. (2017). *Salmonella enterica* serovar infantis from food and human infections, Switzerland, 2010-2015: Poultry-related multidrug resistant clones and an emerging ESBL producing clonal lineage. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUL). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01322>

- Hopkins, K. L., Arnold, C., & Threlfall, E. J. (2007). Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing® technology. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.07.006>
- Illumina. (2011). *Quality Scores for Next-Generation Sequencing*. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/
- Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima), Oficina de laboratorios y control de calidad, & Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Bebidas. (2017). Alerta por la primera detección del gen *mcr-1* de resistencia al antibiótico colistina en aislamientos de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Give en alimentos en Colombia. *Invima*. <https://doi.org/10.1016/S1473-3099>
- Jaén-Luchoro, D., Busquets, A., Karlsson, R., Salvà-Serra, F., Åhrén, C., Karami, N., & Moore, E. R. B. (2020). Genomic and proteomic characterization of the extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* strain CCUG 73778: A virulent, nosocomial outbreak strain. *Microorganisms*, 8(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060893>
- Jain, C., Koren, S., Dilthey, A., Phillippy, A. M., & Aluru, S. (2018). A fast adaptive algorithm for computing whole-genome homology maps. *Bioinformatics*, 34(17), i748–i756. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty597>
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

- Jans, C., Sarno, E., Collineau, L., Meile, L., Stärk, K. D. C., & Stephan, R. (2018). Consumer exposure to antimicrobial resistant bacteria from food at Swiss retail level. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00362>
- Jean M. Whichard, * Kathryn Gay,*¹ Jennifer E. Stevenson,*² Kevin J. Joyce,* Kara L. Cooper,* Michael Omondi,* Felicita Medalla,* George A. Jacoby,† and Timothy J. Barrett*. (2007). *The National Antimicrobial Resistance Monitoring Sys-tem monitors susceptibility among Enterobacteriaceae in humans in the*. www.cdc.gov/eid
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Research*, 3. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S. Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Jovčić, B., Novović, K., Filipić, B., Velhner, M., Todorović, D., Matović, K., Rašić, Z., Nikolić, S., Kiškarolj, F., & Kojić, M. (2020). Genomic characteristics of colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Infantis* from poultry farms in the Republic of Serbia. *Antibiotics*, 9(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120886>
- Kato, A., Chen, H. D., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2012). Reciprocal Control between a Bacterium's Regulatory System and the Modification Status of Its Lipopolysaccharide. *Molecular Cell*, 47(6), 897–908. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.017>

- Kawasaki, K. (2012). Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. *Food Research International*, 45(2), 493–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.026>
- Koutsolioutsou, A., Martins, E. A., White, D. G., Levy, S. B., & Demple, B. (2001). A soxRS-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Seroovar typhimurium). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 38–43. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.38-43.2001>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Cesare, A. de, Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Dewulf, J., Hald, T., Michel, V., ... Davies, R. (2019). *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal*, 17(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>
- Kruij, S. L., van Cuyck, H., & Koeck, J. L. (2011). Multilocus variable number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 30, Issue 4, pp. 465–473). <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1110-0>
- Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. In *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61964>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2021a). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and

- insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2021b). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- Kürekci, C., Sahin, S., Iwan, E., Kwit, R., Bomba, A., & Wasyl, D. (2021c). Whole-genome sequence analysis of *Salmonella* Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108956>
- Lander, E. S., & Waterman, M. S. (1988). Genomic Mapping by Fingerprinting Random Clones: A Mathematical Analysis. In *GENOMICS* (Vol. 2).
- Larsen, M. v., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lee, I., Chalita, M., Ha, S. M., Na, S. I., Yoon, S. H., & Chun, J. (2017). ContEst16S: An algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 2053–2057. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001872>
- Lepuschitz, S., Schill, S., Stoeger, A., Pekard-Amenitsch, S., Huhulescu, S., Inreiter, N., Hartl, R., Kerschner, H., Sorschag, S., Springer, B., Brisse, S., Allerberger, F., Mach, R. L., & Ruppitsch, W. (2019). Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-

- producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Science of the Total Environment*, 662, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.179>
- Li, L., Olsen, R. H., Song, A., Xiao, J., Wang, C., Meng, H., & Shi, L. (2021). First Report of a Foodborne *Salmonella enterica* Serovar Gloucester (4:i:l,w) ST34 Strain Harboring blaCTX-M-55 and qnrS Genes Located in IS26-Mediated Composite Transposon. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.646101>
- Liao, J., Orsi, R. H., Carroll, L. M., Kovac, J., Ou, H., Zhang, H., & Wiedmann, M. (2019). Serotype-specific evolutionary patterns of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica*. *BMC Evolutionary Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1457-5>
- Liao, X., Li, M., Zou, Y., Wu, F. X., Yi-Pan, & Wang, J. (2019). Current challenges and solutions of de novo assembly. In *Quantitative Biology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 90–109). Higher Education Press. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0166-9>
- Ling, J. M., Chan, E. W., Lam, A. W., & Cheng, A. F. (2003). Mutations in Topoisomerase Genes of Fluoroquinolone-Resistant *Salmonellae* in Hong Kong. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11), 3567–3573. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3567-3573.2003>
- Litrup, E., Kiil, K., Hammerum, A. M., Roer, L., Nielsen, E. M., & Torpdahl, M. (2017). Plasmid-borne colistin resistance gene mcr-3 in *Salmonella* isolates from human infections, Denmark, 2009-17. *Eurosurveillance*, 22(31). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30587>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism

- MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Lomazzi, M., Moore, M., Johnson, A., Balasegaram, M., & Borisch, B. (2019). Antimicrobial resistance - Moving forward? In *BMC Public Health* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7173-7>
- Lomonaco, S., Crawford, M. A., Lascols, C., Timme, R. E., Anderson, K., Hodge, D. R., Fisher, D. J., Pillai, S. P., Morse, S. A., Khan, E., Hughes, M. A., Allard, M. W., & Sharma, S. K. (2018). Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198526>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (1999). Activation of the Cryptic *aac(6)-Iy* Aminoglycoside Resistance Gene of *Salmonella* by a Chromosomal Deletion Generating a Transcriptional Fusion. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 181, Issue 21).
- Mąka, Ł., Maćkiw, E., Stasiak, M., Wołkowicz, T., Kowalska, J., Postupolski, J., & Popowska, M. (2018). Ciprofloxacin and nalidixic acid resistance of *Salmonella* spp. isolated from

- retail food in Poland. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 1–4.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.012>
- Mąka, Ł., & Popowska, M. (2016). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 67(4), 343–358.
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4647–4654. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab199>
- Marçais, G., Delcher, A. L., Phillippy, A. M., Coston, R., Salzberg, S. L., & Zimin, A. (2018). MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Computational Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- McClelland, M., Sanderson, K., Spieth, J., Clifton, S., Latreille, P., Courtney, L., & Porwollik, S. (2001, October 25). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 26, 852–856. <http://www.sanger.ac.uk/Software/>
- McDermott, P. F., Tyson, G. H., Kabera, C., Chen, Y., Li, C., Folster, J. P., Ayers, S. L., Lam, C., Tate, H. P., & Zhao, S. (2016). Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(9), 5515–5520. <https://doi.org/10.1128/AAC.01030-16>
- Mejía, L., Medina, J. L., Bayas, R., Salazar, C. S., Villavicencio, F., Zapata, S., Matheu, J., Wagenaar, J. A., González-Candelas, F., & Vinuela-Burgos, C. (2020). Genomic

- Epidemiology of *Salmonella* Infantis in Ecuador: From Poultry Farms to Human Infections. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.547891>
- Mendes, A., Rodrigues, C., Pires, J., Amorim, J., Ramos, M., Novais, A., & Peixe, L. (2016). Importation of Fosfomycin Resistance *fosA3* Gene to Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(2), 346–348. <https://doi.org/10.3202/eid2202.151301>
- Mendes Oliveira, V. R., Paiva, M. C., & Lima, W. G. (2019). Plasmid-mediated colistin resistance in Latin America and Caribbean: A systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 31(July), 101459. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.07.015>
- Mlynarcik, P., & Kolar, M. (2019). Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. *Biomedical Papers*, 163(1), 28–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2018.070>
- Monk, J. M. (2019). Predicting antimicrobial resistance and associated genomic features from whole-genome sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(2), 1–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.01610-18>
- Moon, K., & Gottesman, S. (2009). A *PhoQ/P*-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Molecular Microbiology*, 74(6), 1314–1330. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06944.x>
- Moulin, G., Catry, B., Baptiste, K., Cavaco, L., Jukes, H., Kluytmans, J., Liebana, E., Navas, A. L., Magiorakos, A.-P., Monnet, D., Madero, C. M., Pomba, C., Powell, M., Rantala, M., Skov, R. L., Threlfall, J., & Törneke, K. (2016). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. *European Medicines Agency*, 44(July), 56. <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/updated-advice-use->

colistin-products-animals-within-european-union-development-resistance-possible_en.pdf

- Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2002). The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4161–4167. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002>
- Nair, D. V. T., Venkitanarayanan, K., & Johny, A. K. (2018). Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/foods7100167>
- Neuert, S., Nair, S., Day, M. R., Doumith, M., Ashton, P. M., Mellor, K. C., Jenkins, C., Hopkins, K. L., Woodford, N., de Pinna, E., Godbole, G., & Dallman, T. J. (2018). Prediction of phenotypic antimicrobial resistance profiles from whole genome sequences of non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00592>
- Nishino, K., Hsu, F. F., Turk, J., Cromie, M. J., Wösten, M. M. S. M., & Groisman, E. A. (2006). Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Molecular Microbiology*, 61(3), 645–654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05273.x>
- Nishino, K., Latifi, T., & Groisman, E. A. (2006). Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 59(1), 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>

- Nishino, K., Nikaido, E., & Yamaguchi, A. (2007). Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 9066–9075. <https://doi.org/10.1128/JB.01045-07>
- Olaitan, A. O., Dia, N. M., Gautret, P., Benkouiten, S., Belhouchat, K., Drali, T., Parola, P., Brouqui, P., Memish, Z., Raoult, D., & Rolain, J. M. (2015). Acquisition of extended-spectrum cephalosporin- and colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Newport by pilgrims during Hajj. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.01.010>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014a). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 5, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Olubisose, E. T., Ajayi, A., Adeleye, A. I., & Smith, S. I. (2021). Molecular and phenotypic characterization of efflux pump and biofilm in multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* Serovars isolated from food animals and handlers in Lagos Nigeria. *One Health Outlook*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00035-w>
- Oniciuc, E. A., Likotraftiti, E., Alvarez-Molina, A., Prieto, M., Santos, J. A., & Alvarez-Ordóñez, A. (2018). The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain. *Genes*, 9(5), 1–28. <https://doi.org/10.3390/genes9050268>
- O'Regan, E., Quinn, T., Pages, J. M., McCusker, M., Piddock, L., & Fanning, S. (2009). Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar eNteritidis: Involvement of ramA and other global regulators.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1080–1087.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01005-08>
- Osei Sekyere, J., Govinden, U., Bester, L. A., & Essack, S. Y. (2016). Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 601–617.
<https://doi.org/10.1111/jam.13169>
- Otter, J. A., Doumith, M., Davies, F., Mookerjee, S., Dyakova, E., Gilchrist, M., Brannigan, E. T., Bamford, K., Galletly, T., Donaldson, H., Aanensen, D. M., Ellington, M. J., Hill, R., Turton, J. F., Hopkins, K. L., Woodford, N., & Holmes, A. (2017). Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Scientific Reports*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12637-4>
- Pishnian, Z., Haeili, M., & Feizi, A. (2019). Prevalence and molecular determinants of colistin resistance among commensal Enterobacteriaceae isolated from poultry in northwest of Iran. *Gut Pathogens*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0282-0>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmanna, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 30, Issue 2, pp. 557–596). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Pornsukarom, S., & Thakur, S. (2017). *Horizontal Dissemination of Antimicrobial Resistance Determinants in Multiple Salmonella Serotypes following Isolation from the Commercial Swine Operation Environment after Manure Application*. <https://doi.org/10.1128/AEM>

- Pornsukarom, S., van Vliet, A. H. M., & Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC Genomics*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5137-4>
- Qian, H., Cheng, S., Liu, G., Tan, Z., Dong, C., Bao, J., Hong, J., Jin, D., Bao, C., & Gu, B. (2020). Discovery of seven novel mutations of *gyrB*, *parC* and *parE* in *Salmonella* Typhi and Paratyphi strains from Jiangsu Province of China. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64346-0>
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Español, A. R., Colantonio, L. D., & Burrone, M. S. (2016). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp isolated animal food for human consumption. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, *33*(1), 32–44. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2016.331.1899>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, *26*(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Ranjbar, R., Rahmati, H., & Shokoohizadeh, L. (2018). Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench. Detection of common clones of *Salmonella enterica* serotype Infantis from human sources in Tehran hospitals. In *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* (Vol. 11, Issue 1). www.cdc.gov/pulse.net
- Rau, R. B., de Lima-Morales, D., Wink, P. L., Ribeiro, A. R., & Barth, A. L. (2020). *Salmonella enterica* mcr-1 Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. *Foodborne Pathogens and Disease*, *17*(3), 202–208. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2700>

- Realpe-Quintero, M., Barba-León, J., Pérez-Montaña, J. A., Pacheco-Gallardo, C., González-Aguilar, D., Dominguez-Arias, R. M., & Cabrera-Diaz, E. (2018). Genetic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes recovered throughout the beef production chain and from patients with salmonellosis. *PeerJ*, 2018(8). <https://doi.org/10.7717/peerj.5482>
- Rehman, M. A., Hasted, T. L., Persaud-Lachhman, M. G., Yin, X., Carrillo, C., & Diarra, M. S. (2019). Genome Analysis and Multiplex PCR Method for the Molecular Detection of Coresistance to Cephalosporins and Fosfomycin in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *Journal of Food Protection*, 82(11), 1938–1949. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-205>
- Rensch, U., Nishino, K., Klein, G., & Kehrenberg, C. (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium multidrug efflux pumps EmrAB and AcrEF support the major efflux system AcrAB in decreased susceptibility to triclosan. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 44, Issue 2, pp. 179–180). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.002>
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., & Letellier, A. (2016a). Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01789>
- Ricci, V., Zhang, D., Teale, C., & Piddock, L. J. V. (2020). The o-antigen epitope governs susceptibility to colistin in *Salmonella enterica*. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02831-19>

- Rocha, V. F. D., Barbosa, M. S., Leal, H. F., Silva, G. E. O., Sales, N. M. M. D., Monteiro, A. de S. S., Azevedo, J., Malheiros, A. R. X., Ataíde, L. A., Moreira, B. M., Reis, M. G., Bahia, F. M. M., & Reis, J. N. (2022). Prolonged Outbreak of Carbapenem and Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* at a Large Tertiary Hospital in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.831770>
- Roland, K. L., Martin, L. E., Esther, C. R., & Spitznagel, J. K. (1993). Spontaneous pmrA Mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 Define a New Two-Component Regulatory System with a Possible Role in Virulence. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- Salipante, S. J., & Hall, B. G. (2003). Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. *Molecular Biology and Evolution*, 20(4), 653–659. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg074>
- Samantha, A., & Vrielink, A. (2020). Lipid A Phosphoethanolamine Transferase: Regulation, Structure and Immune Response. *Journal of Molecular Biology*, 432(18), 5184–5196. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.04.022>
- Sampei, G. ichi, Furuya, N., Tachibana, K., Saitou, Y., Suzuki, T., Mizobuchi, K., & Komano, T. (2010). Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64. *Plasmid*, 64(2), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.05.005>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sia, C. M., Greig, D. R., Day, M., Hartman, H., Painset, A., Doumith, M., Meunier, D., Jenkins, C., Chattaway, M. A., Hopkins, K. L., Woodford, N., Godbole, G., & Dallman, T. J. (2020). The characterization of mobile colistin resistance (Mcr) genes among 33 000 salmonella

- enterica genomes from routine public health surveillance in england. *Microbial Genomics*, 6(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000331>
- Son, S. J., Huang, R., Squire, C. J., & Leung, I. K. H. (2019). MCR-1: a promising target for structure-based design of inhibitors to tackle polymyxin resistance. In *Drug Discovery Today* (Vol. 24, Issue 1, pp. 206–216). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.004>
- Song, S., Lee, B., Yeom, J. H., Hwang, S., Kang, I., Cho, J. C., Ha, N. C., Bae, J., Lee, K., & Kim, Y. H. (2015). MdsABC-mediated pathway for pathogenicity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity*, 83(11), 4266–4276. <https://doi.org/10.1128/IAI.00653-15>
- Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. In *Food Research International* (Vol. 45, Issue 2, pp. 455–481). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>
- Sun, S., Negrea, A., Rhen, M., & Andersson, D. I. (2009). Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2298–2305. <https://doi.org/10.1128/AAC.01016-08>
- Tadesse, D. A., Hoffmann, M., Sarria, S., Lam, C., Brown, E., Allard, M., & Mcdermott, P. F. (n.d.). *Complete Genome Sequences of 14 Salmonella enterica Serovar Enteritidis Strains Recovered from Human Clinical Cases between 1949 and 1995 in the United States*. [10.1128/genomeA.01406-17](https://doi.org/10.1128/genomeA.01406-17)
- Tang, S., Orsi, R. H., Luo, H., Ge, C., Zhang, G., Baker, R. C., Stevenson, A., & Wiedmann, M. (2019). Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods

- for Salmonella. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue JULY). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01591>
- Tate, H., Folster, J. P., Hsu, C.-H., Chen, J., Hoffmann, M., Li, C., Morales, C., Tyson, G. H., Mukherjee, S., Brown, A. C., Green, A., Wilson, W., Dessai, U., Abbott, J., Joseph, L., Haro, J., Ayers, S., Mcdermott, P. F., & Zhao, S. (2017). *Comparative Analysis of Extended-Spectrum-Lactamase CTX-M-65-Producing Salmonella enterica Serovar Infantis Isolates from Humans, Food Animals, and Retail Chickens in the United States*.
<https://doi.org/10.1128/AAC>
- Trimble, M. J., Mlynářčík, P., Kolář, M., & Hancock, R. E. W. (2016). Polymyxin: Alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>
- Turlej-Rogacka, A., Xavier, B. B., Janssens, L., Lammens, C., Zarkotou, O., Pournaras, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2018). Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(2), 345–353. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3140-3>
- Uelze, L., Borowiak, M., Deneke, C., Szabó, I., Fischer, J., & Tausch, S. H. (2020). *crossm Performance and Accuracy of Four Open-Source Tools for In*. 86(5), 1–14.
- Wagner, M. A., Bischof, K., Kati, D., & Koraimann, G. (2013). Silencing and activating type IV secretion genes of the F-like conjugative resistance plasmid R1. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 12), 2481–2491. <https://doi.org/10.1099/mic.0.071738-0>
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An integrated tool for

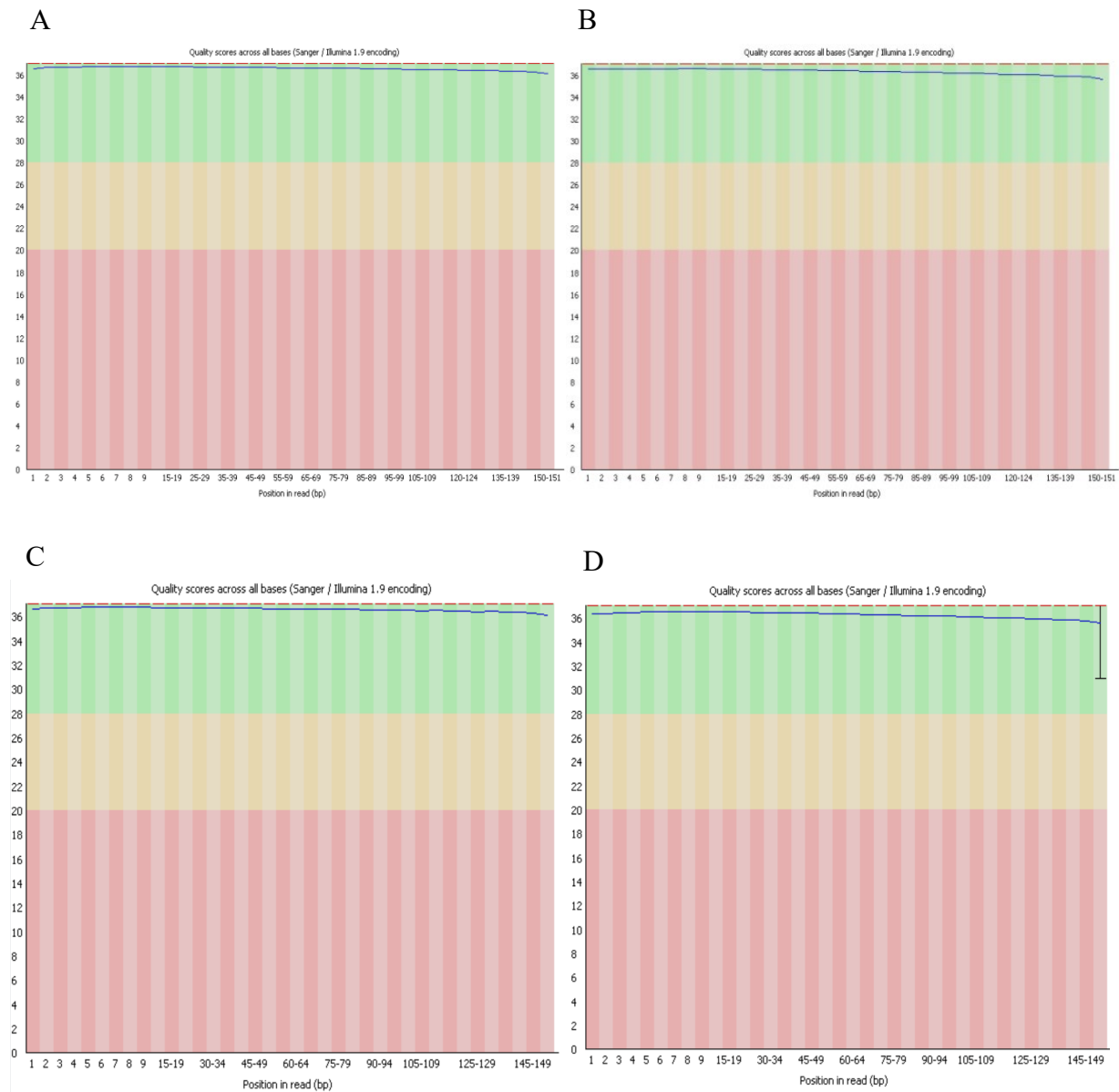
- comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, W., Baloch, Z., Zou, M., Dong, Y., Peng, Z., Hu, Y., Xu, J., Yasmeen, N., Li, F., & Fanning, S. (2018). Complete genomic analysis of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate cultured from ready-to-eat pork in China carrying one large plasmid containing mcr-1. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00616>
- WHO - Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance (IACG). (2019). *Informe Para El Secretario General De Las Naciones Unidas*. 27. https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wick, R. R., Schultz, M. B., Zobel, J., & Holt, K. E. (2015). Bandage: Interactive visualization of de novo genome assemblies. *Bioinformatics*, 31(20), 3350–3352. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv383>
- Win, A. T., Supa-amornkul, S., Orsi, R. H., Carey, J. H., Wolfgang, W. J., & Chaturongakul, S. (2021). Sequence Analyses and Phenotypic Characterization Revealed Multidrug Resistant Gene Insertions in the Genomic Region Encompassing Phase 2 Flagellin Encoding fljAB Genes in Monophasic Variant *Salmonella enterica* Serovar 4,5,12:i:- Isolates From Various

- Sources in Thailand. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.720604>
- Xiong, A., Gottman, A., Park, C., Baetens, M., Pandza, S., & Matin, A. (2000). *The EmrR Protein Represses the Escherichia coli emrRAB Multidrug Resistance Operon by Directly Binding to Its Promoter Region* (Vol. 44, Issue 10).
- Yamile Saavedra, S., Diaz, L., Wiesner, M., Correa, A., Alejandra Arévalo, S., Reyes, J., Melissa Hidalgo, A., de la Cadena, E., Perenguez, M., Angeline Montaña, L., Ardila, J., Ríos, R., Victoria Ovalle, M., Díaz, P., Porras, P., Villegas, M. v, Arias, C. A., Beltrán, M., Duarte, C., & Saavedra, C. S. (2012). *Genomic and Molecular Characterization of Clinical Isolates of Enterobacteriaceae Harboring mcr-1 in Colombia, 2002 to 2016*.
<https://journals.asm.org/journal/aac>
- Yap, P. S. X., Ahmad Kamar, A., Chong, C. W., Yap, I. K. S., & Teh, C. S. J. (2020). Whole genome analysis of multidrug resistant *Citrobacter freundii* B9-C2 isolated from preterm neonate's stool in the first week. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 246–251.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.03.024>
- Yoon, S. H., Ha, S. min, Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(10), 1281–1286.
<https://doi.org/10.1007/s10482-017-0844-4>
- Yoshida, C. E., Kruckiewicz, P., Laing, C. R., Lingohr, E. J., Gannon, V. P. J., Nash, J. H. E., & Taboada, E. N. (2016). The salmonella in silico typing resource (SISTR): An open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft *Salmonella* genome assemblies. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147101>

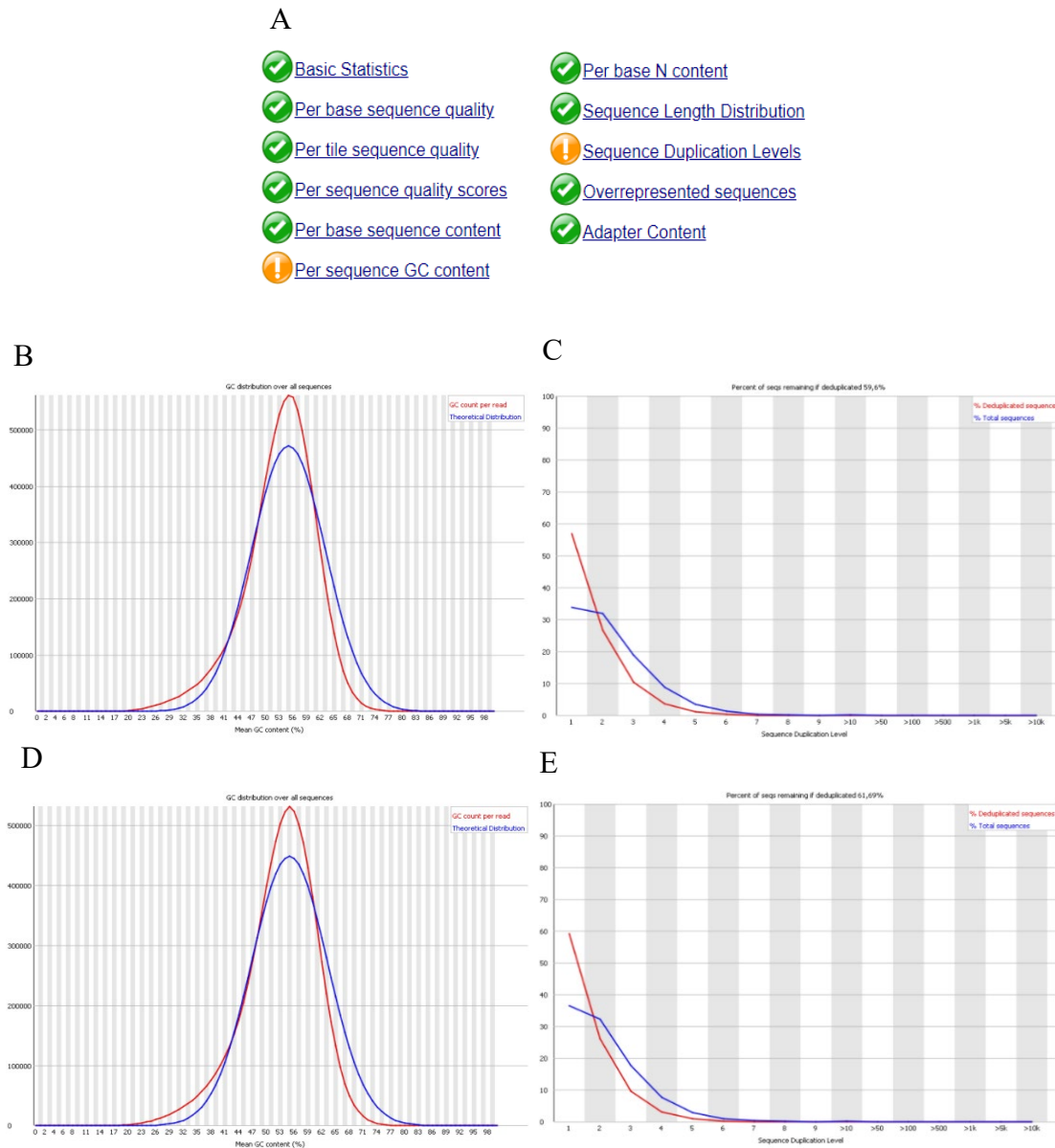
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., & Qiu, J. (2015). Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zatyka, M., & Thomas, C. M. (1998). Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(4), 291–319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00355.x>
- Zhang, L., Fu, Y., Xiong, Z., Ma, Y., Wei, Y., Qu, X., Zhang, H., Zhang, J., & Liao, M. (2018). Highly prevalent multidrug-resistant *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02104>
- Zhang, S., Yin, Y., Jones, M. B., Zhang, Z., Kaiser, B. L. D., Dinsmore, B. A., Fitzgerald, C., Fields, P. I., & Deng, X. (2015). *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1685–1692. <https://doi.org/10.1128/JCM.00323-15>

Apéndices

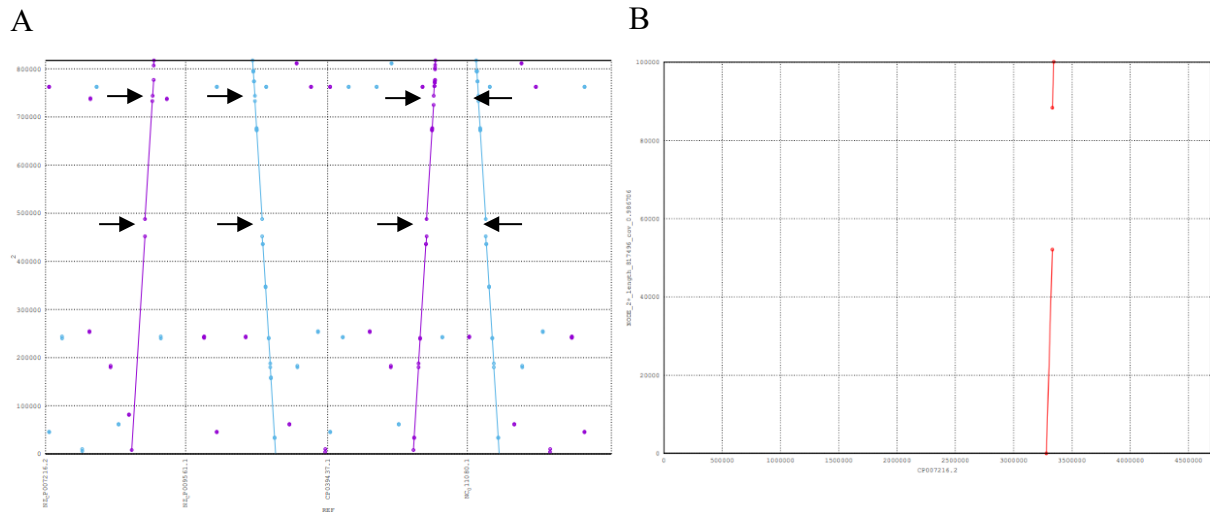
Apéndice A. Calidad de secuencia por base en FastQC



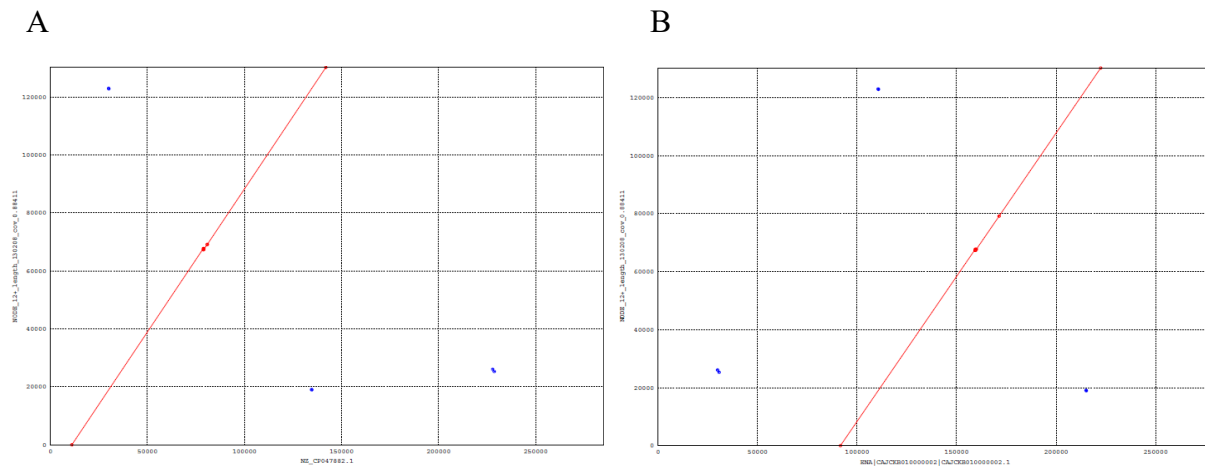
Nota: Las figuras A y B corresponden a las cadenas *forward* y *reverse* del aislamiento 25TBS. Las figuras C y D corresponden a las cadenas *forward* y *reverse* del aislamiento 33TXLD.

Apéndice B. Contenido de GC por secuencia y niveles de duplicación por secuencia en FastQC

Nota: La figura A muestra los parámetros evaluados por el programa FastQC. Se presentan las gráficas correspondientes a los módulos contenido de GC y niveles de duplicación por secuencia; B y C corresponden a la cadena *forward* del aislamiento 25TBS; D y E corresponden a la cadena *forward* del aislamiento 33TXLD.

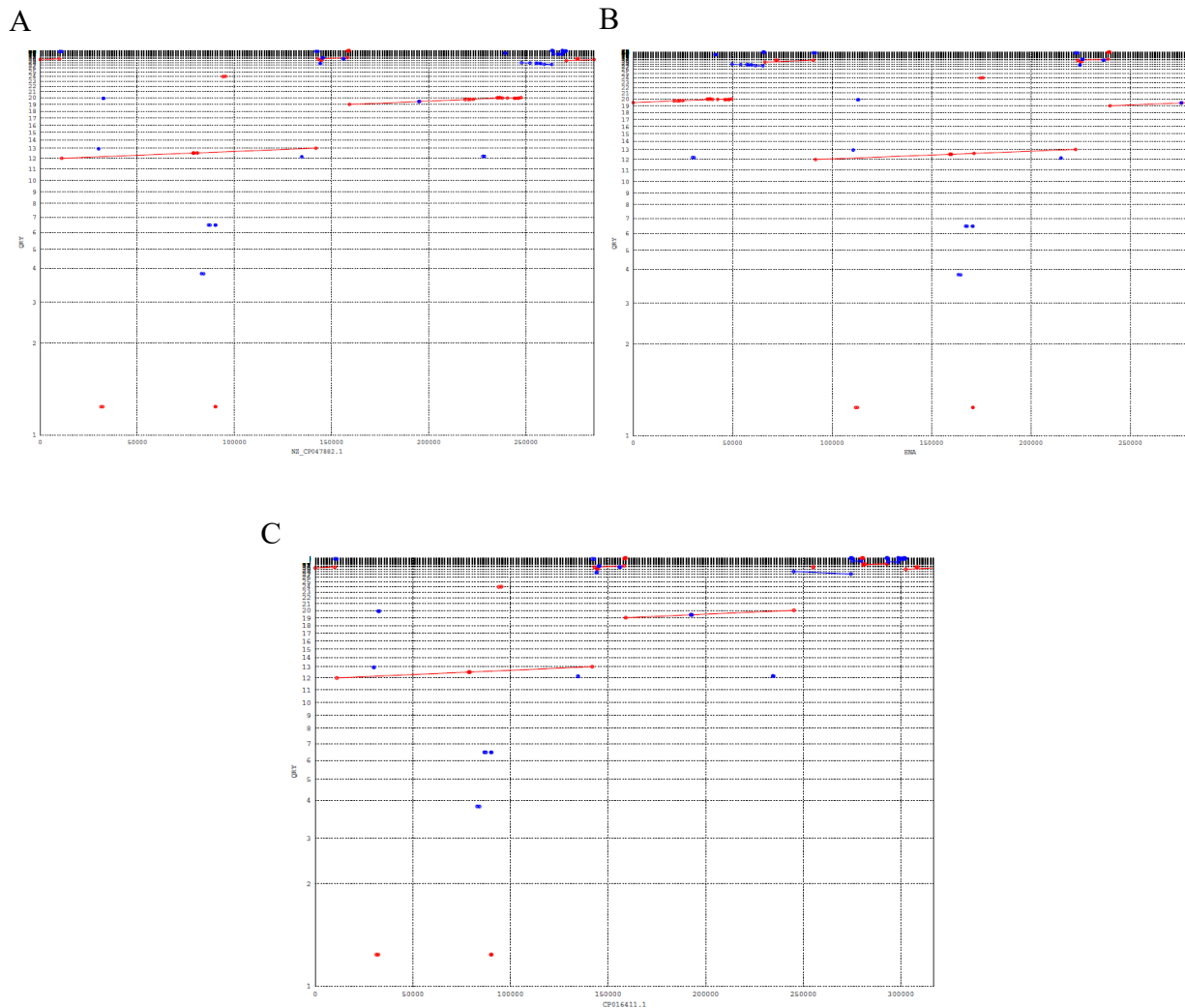
Apéndice C. Gráficas del alineamiento del *contig 2* usando Mashmap y Nucmer

Nota: La figura A muestra la gráfica del alineamiento del *contig 2* del genoma 25TBS con los genomas de referencia usando Mashmap, las flechas señalan los *gaps* en las posiciones 451000 a 488000 pb y 733000 a 743000 pb aproximadamente. La figura B muestra la gráfica del alineamiento de la región donde está el *gap* (451000 a 488000 pb) del *contig 2* con el genoma de *S. Newport* (NZ_CP007216.2) usando Nucmer.

Apéndice D. Gráficas del alineamiento del *contig* 12 con dos plásmidos de referencia.

Nota: La figura A muestra el alineamiento entre el plásmido pESI19944 (eje X) y el *contig* 12 (eje Y). La figura B muestra el alineamiento entre el plásmido pESI2747 (eje X) y el *contig* 12 (eje Y). Alineamientos con Nucmer graficados con mummerplot.

Apéndice E. Alineamiento entre los genomas pESI de referencia y el genoma completo de 33TXLD



Nota: Se muestra la gráfica del alineamiento con Nucmer del genoma completo del aislamiento 33TXLD (QRY) con el genoma del megaplásmido pESI119944 (NZ_CP047882.1) (A), pESI2747 (ENA CAJCKB010000002|CAJCKB010000002.1) (B) y pN55391 (CP016411.1) (C). Los alineamientos fueron graficados con mummerplot.

Apéndice F. Proteínas de referencia usadas en la comparación de arquitectura de dominios y para los alineamientos con las proteínas similares a MCR identificadas

Proteína referencia	Plasmídica /Cromosomal	Sensibilidad colistina	Acceso Genbank	Referencia
MCR-1.1 (<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium)	Plasmídica	Resistente	RWU66024.1	Rau et al., 2020
EptA (<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium LT2)	Cromosomal	Sensible	NP_463158.1	Tamayo et al., 2005; Wanty et al., 2013
EptA (<i>S. enterica</i> ser. Infantis)	Cromosomal	Resistente	NVP19872.1	Jovčić et al., 2020
EptA (<i>S. enterica</i> ser. Newport)	Cromosomal	Resistente	WP_000919310 .1	Olaitan et al., 2015
EptB (<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium LT2)	Cromosomal	Sensible	NP_462536.1	Tamayo et al., 2005; Wanty et al., 2013

Apéndice G. Resultados de InterProScan para la anotación de los genomas 25TBS y 33TXLD

Proteína	Inicio	Fin	Score (e-value)	Anotacione InterPro Código	Anotaciones InterPro - Descripción
25TBS_01991	60	209	2.9E-41	IPR012549	Phosphoethanolamine transferase, N-terminal
	238	527	5.7E-50	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
25TBS_02780	57	171	6.5E-18	IPR012549	Phosphoethanolamine transferase, N-terminal
	250	538	4.7E-50	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
25TBS_00962	4	335	8.1E-33	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
25TBS_04107	238	529	5.1E-42	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_04384	57	170	8.3E-18	IPR012549	Phosphoethanolamine transferase, N-terminal
	250	538	4.7E-50	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_02548	59	209	1.5E-41	IPR012549	Phosphoethanolamine transferase, N-terminal
	250	538	3.5E-50	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_04277	238	529	5.1E-42	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_03871	34	273	3.7E-13	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_02908	4	335	7.7E-33	IPR000917	Sulfatase, N-terminal
33TXLD_01841	67	439	2.4E-38	IPR000917	Sulfatase, N-terminal

Nota: en la tabla no se incluyen las proteínas no asociadas con la resistencia a colistina que tenían sólo el dominio sulfatasa.

Apéndice H. *Contigs* del genoma 33TXLD que alinearon con los genomas pESI de referencia y región de alineamiento (en pb)

<i>Contig</i>	pESI119944	<i>Contig</i>	pESI2747	<i>Contig</i>	pN55391
			1 – 20661		
29	1 – 9969	19	22251 23360	29	1 - 9969
			24945 – 39926		
48	9970 - 11070	38	41185 – 41582	48	9970 - 11070
12	11071 -141929	19	42481 – 49479	12	11071 - 141884
			49754 – 54108		
48	141930 – 143030	27	57199 - 57916	48	141885 - 142985
			59314 - 59566		
			61501 – 65272		
30	143031 – 158168	70	65406 – 65533	30	142986 - 158207
55	158190 – 158860	55	65534 – 66204	55	158229 - 158899
70	158861 – 158988	29	66226 – 90533	70	158900 - 159027
	159166 - 195128				159028 - 192384
19	195291 - 218670	48	90534 – 91634	19	192360 - 192935
	220260 - 221369				192911 – 245173
	222954 – 237934				
38	239193 – 239590	12	91635 – 222401	27	245166 – 274415
19	240489 – 247487	48	222402 - 223502	70	274416 – 274543
	247762 - 252116				
27	255207 - 255924	30	223503 - 238719	55	274544 – 275214
	257322 -257574				
	259509 – 263280				
70	263414 – 263541	55	238741 - 239411	38	275236 – 279713
55	263542 – 264212	70	239412 - 239539	55	279735 – 280405
			239717 – 275456		
36	264213 – 268697	19	275432 – 275675	70	280406 – 280533
			275838 - 278543		

70	268698 – 268825	-	-	32	280534 – 292719
47	268826 – 270050	-	-	70	292720 – 292847
55	270051 – 270721	-	-	55	292848 – 293518
29	270743 – 285081	-	-	36	293519 – 298614
-	-	-	-	70	298615 – 298742
-	-	-	-	47	298743 – 299967
-	-	-	-	55	299968 – 300638
-	-	-	-	49	300660 – 301655
-	-	-	-	70	301656 – 301783
-	-	-	-	55	301784 – 302454
-	-	-	-	29	302476 – 316814

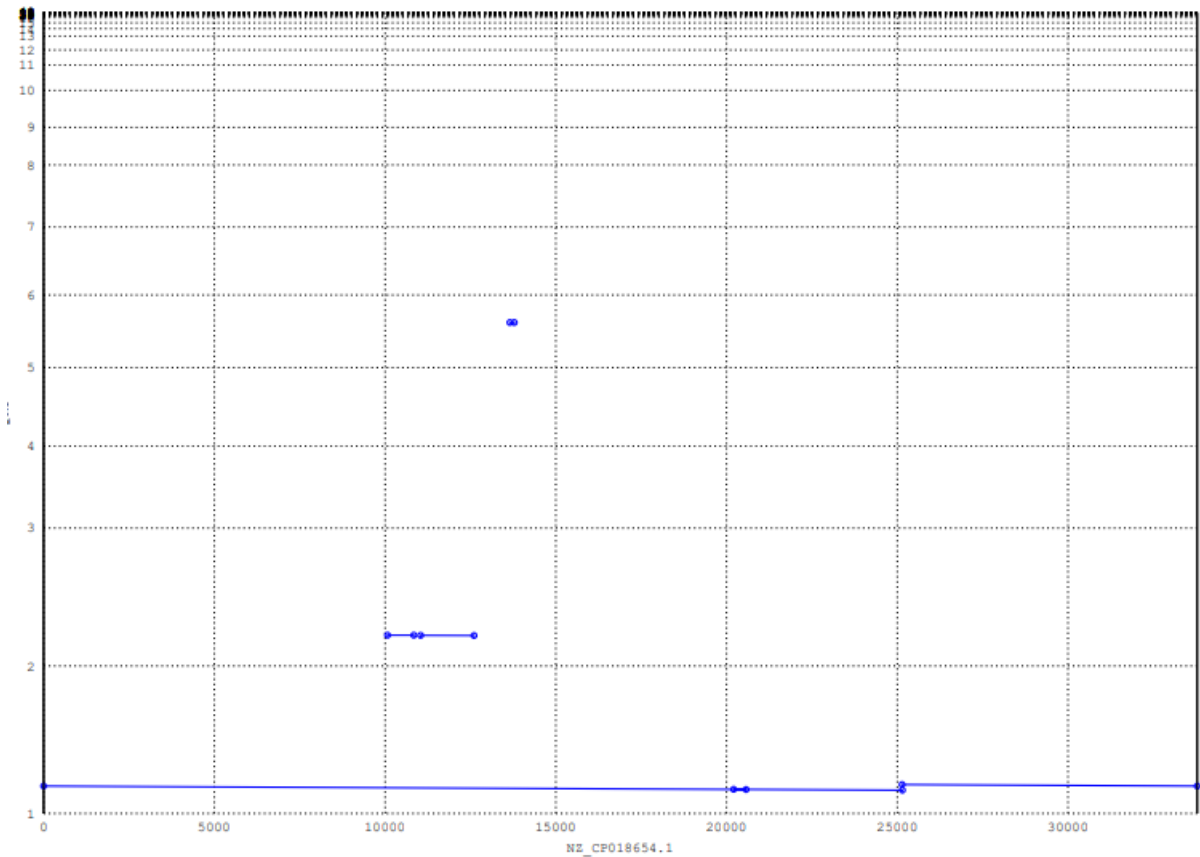
Apéndice I. Resumen de los resultados del *scaffolding* de los *contigs* alineados con cada referencia del megaplásmido

<i>Contigs</i>	Resultados SSPACE	
	Después de extensión	Después de <i>scaffolding</i>
Alineados con pESI119944 Total de <i>contigs</i> = 11, Total de N's = 0	Total de <i>contigs</i> = 11 Total de N's = 0	Total de <i>scaffolds</i> = 9 Total de N's = 2
Alineados con pN55391 Total de <i>contigs</i> = 13 Total de N's = 0	Total de <i>contigs</i> = 13 Total de N's = 0	Total de <i>scaffolds</i> = 10 Total de N's = 142
Alineados con pESI2747 Total de <i>contigs</i> = 7 Total de N's = 0	Total de <i>contigs</i> = 7 Total de N's = 0	Total de <i>scaffolds</i> = 6 Total de N's = 1

Apéndice J. Orden y emparejamiento de los *contigs* en los *scaffolds*

	<i>Contigs</i>	<i>Scaffolds</i>	Tamaño (pb)
Referencia pESI119944	1	1	130508
	9	2	117611
	2 y 10: <i>gap</i> = -243 <i>links</i> = 7	3	90008
	3	4	29518
	4	5	24662
	5	6	15582
	8 y 6: <i>gap</i> -128 <i>links</i> 371	7	6951
	7	8	5164
	11	9	128
Referencia pN55391	1	1	130508
	10	2	117611
	2	3	89208
	3 y 12: <i>gap</i> = -49 <i>links</i> = 234	4	30190
	4	5	24662
	5	6	15582
	6	7	12312
	7 y 11: <i>gap</i> = 103 <i>links</i> = 25	8	8597
	11 y 9: <i>gap</i> = 38 <i>links</i> = 25		
	8	9	5164
Referencia pESI2747	13	10	128
	1	1	130508
	6	2	117611
	2 y 7 <i>gap</i> = -243 <i>links</i> = 7	3	89880
	3	4	29518
	4	5	24662
	5	6	15582

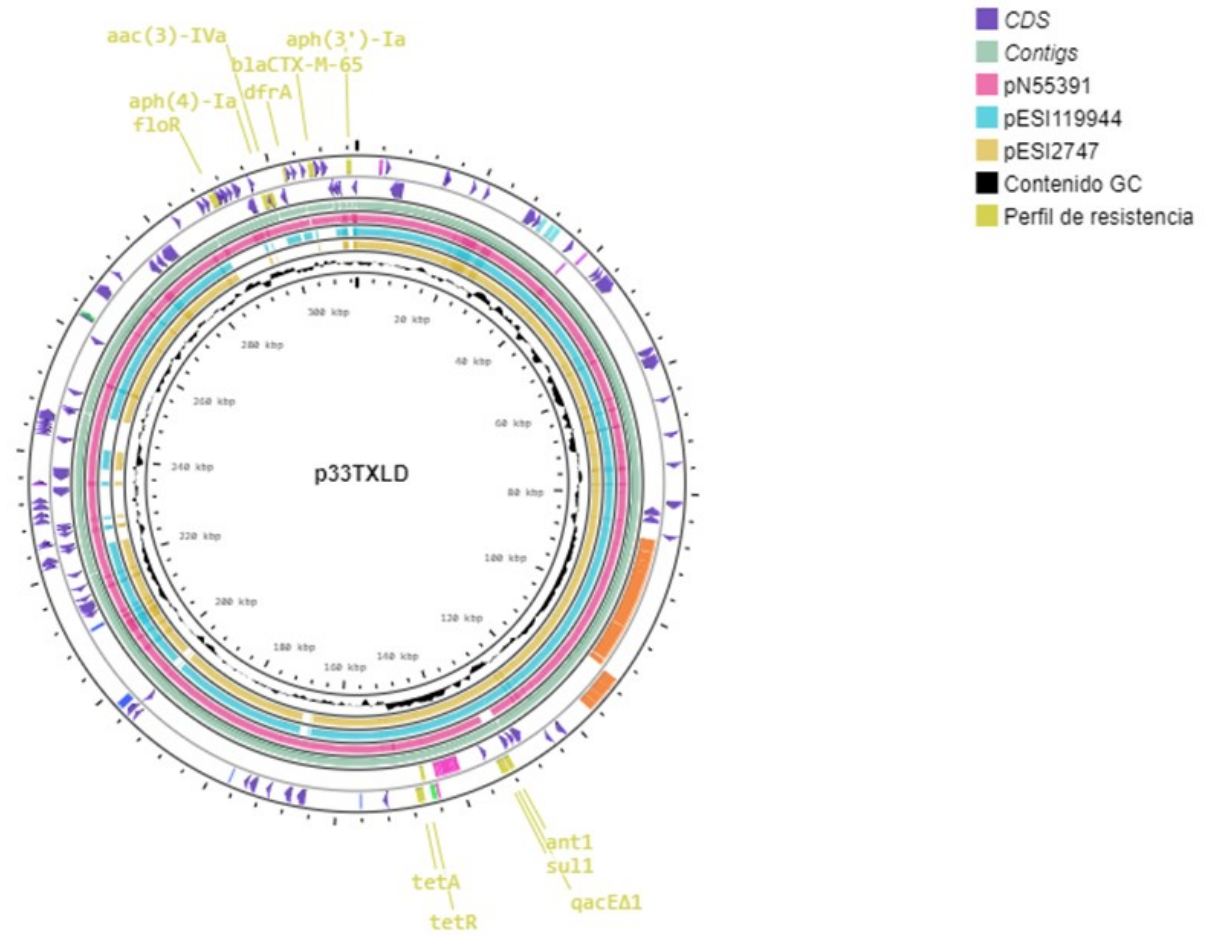
Nota: los *links* hacen referencia a los pares de lecturas que soportan la unión entre los *contigs*.

Apéndice K. Alineamiento entre el plásmido pSE81-1705-3 y los *contigs* de 25TBS

Nota: el eje X representa el plásmido pSE81-1705-3 (NZ_CP018654.1) y eje Y corresponde a los *contigs* de 25TBS. Alineamientos con Nucmer graficados con mummerplot.

Apéndice L. Patrón de resistencia del megaplásmido p33TXLD

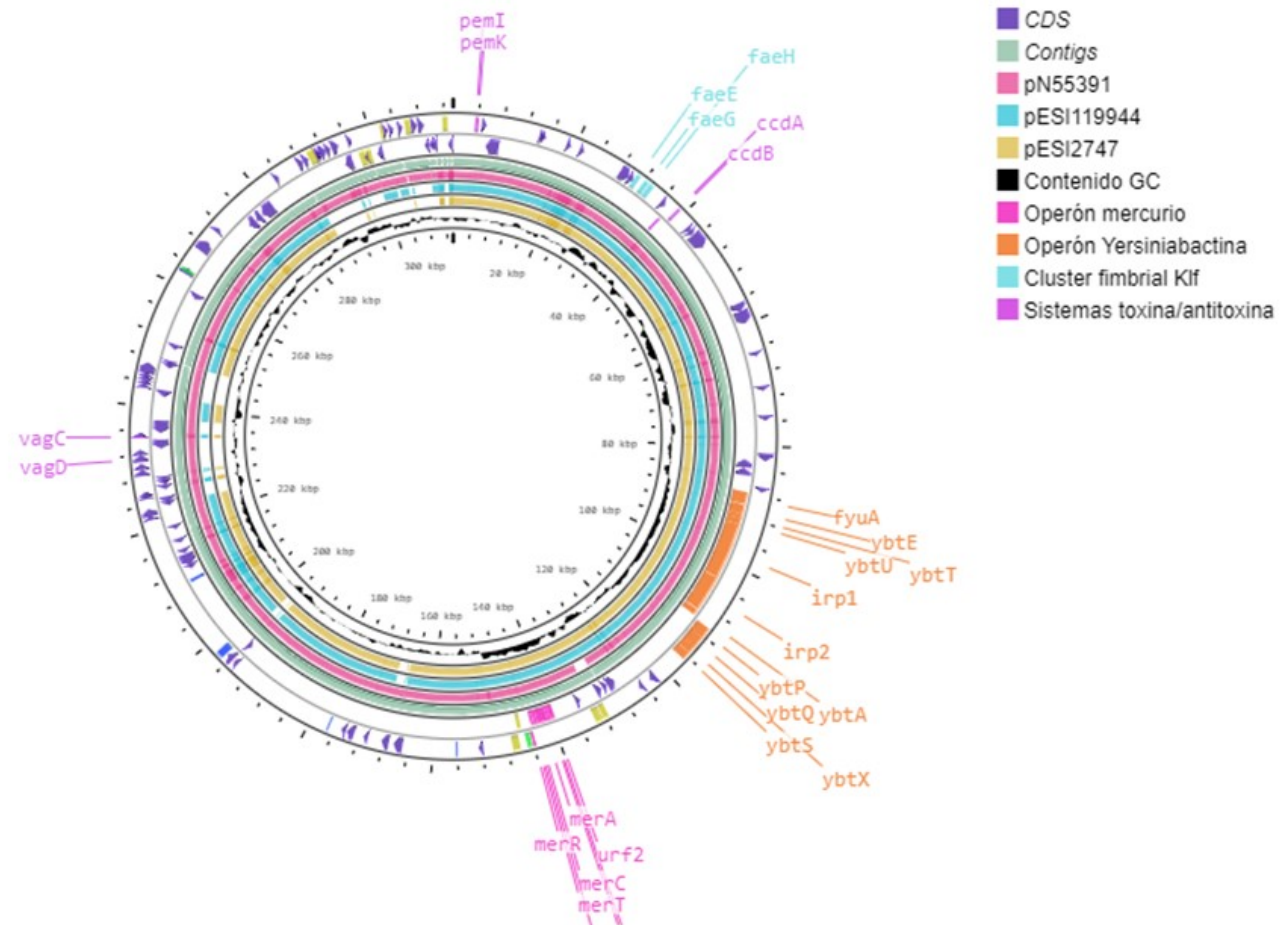
Longitud: 313,466 pb



Nota: Gráfica generada con CGView.

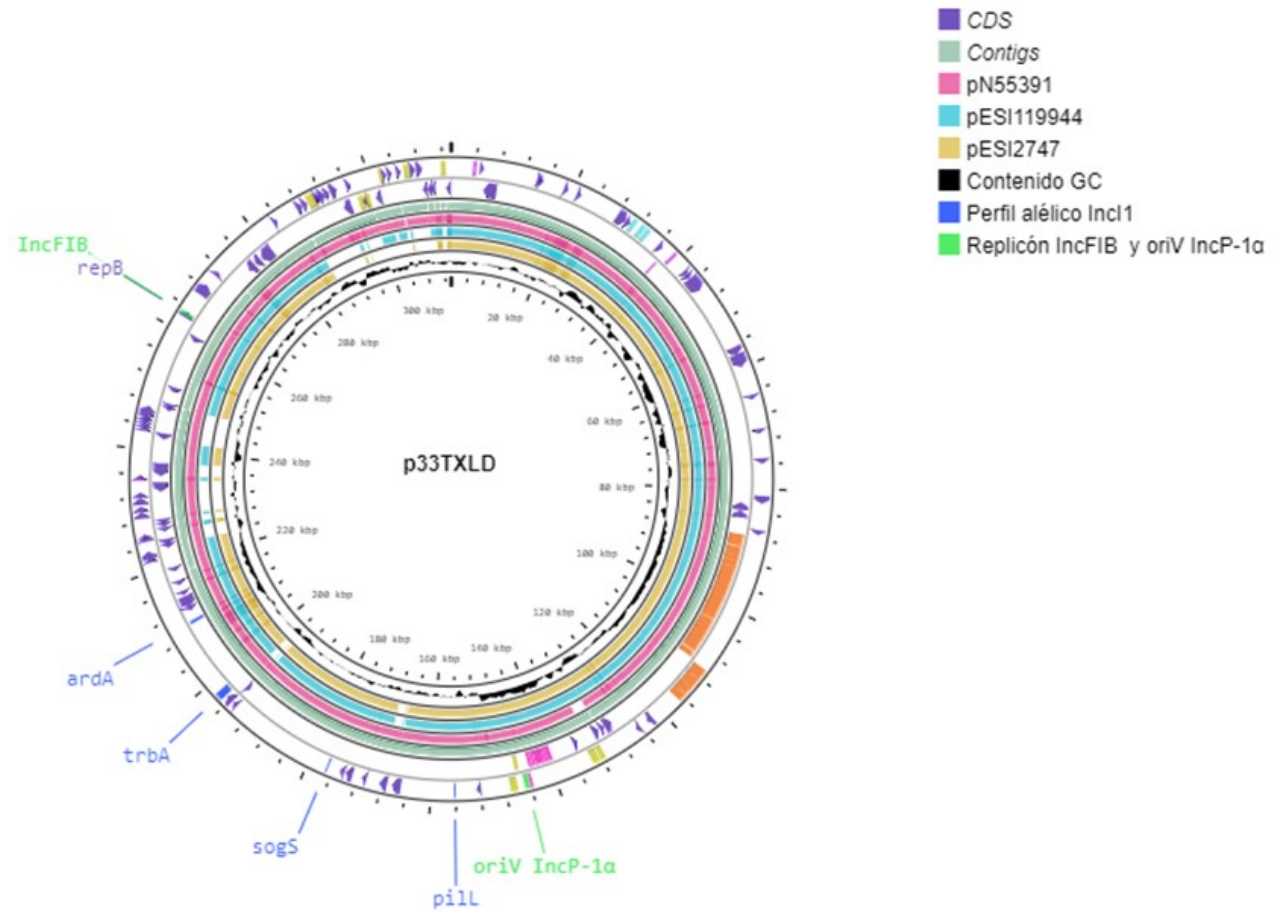
Apéndice M. Características de virulencia y *fitness* del megaplásmido p33TXLD

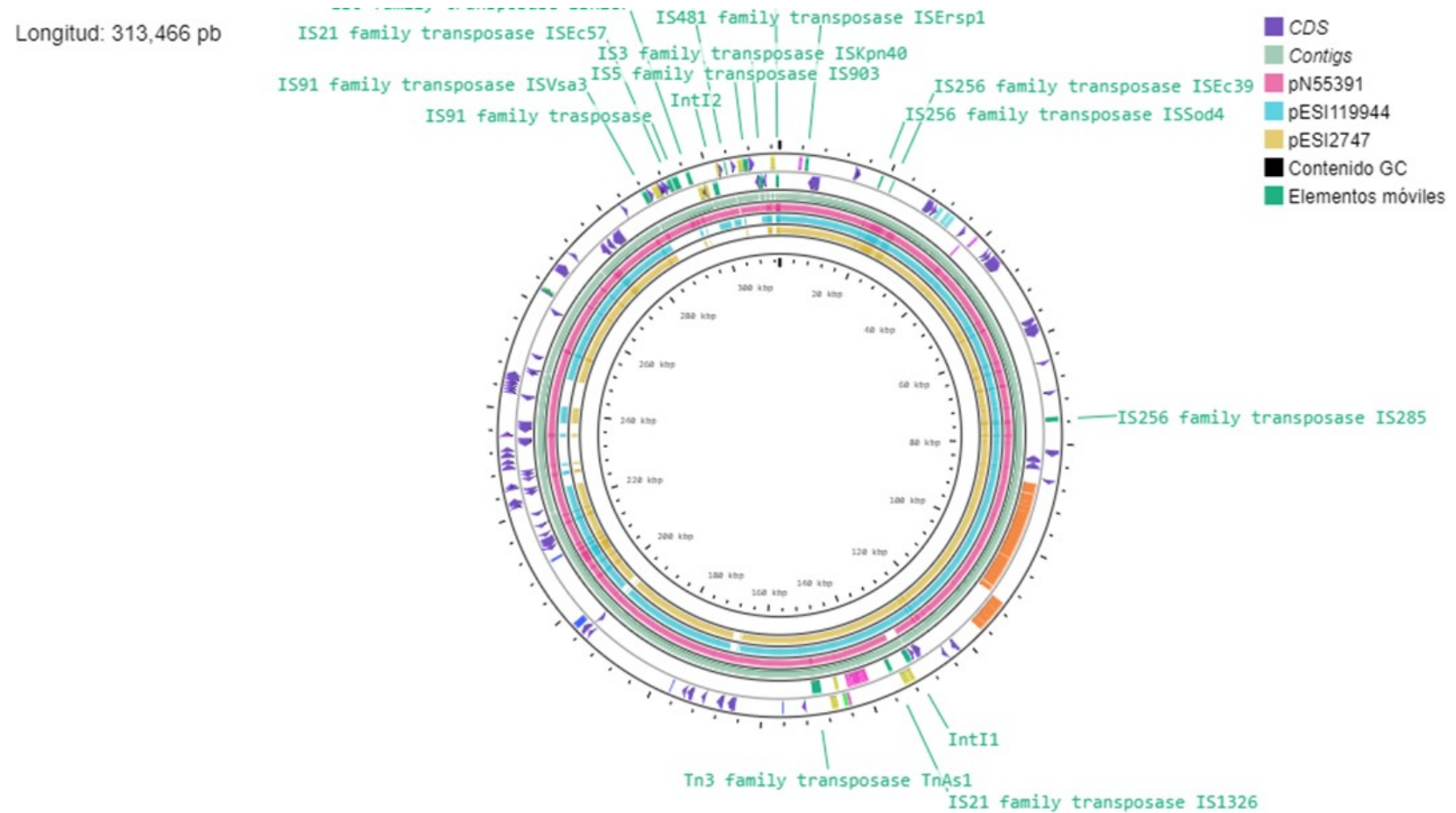
Longitud: 313,466 pb

*Nota:* Gráfica generada con CGView.

Apéndice N. Tipificación plasmídica

Longitud: 313,466 pb

*Nota:* Gráfica generada con CGView.

Apéndice O. Elementos móviles del megaplásmido p33TXLD

Nota: Gráfica generada con CGView.

Apéndice P. Proteínas conjugativas presentes en el megaplásmido p33TXLD

<i>ID query</i>	<i>Proteína</i>	<i>ID (%)</i>	<i>Score</i>	Fracción de alineamiento del <i>query</i> (%)
p33TXLD_00149	TraB	100	367	99,43
p33TXLD_00150	TraC	100	466	99,55
p33TXLD_00154	PilK	84.77	342	99.49
p33TXLD_00155	PilL	100	717	99.71
p33TXLD_00156	PilM	100	291	99.31
p33TXLD_00157	PilN	100	1144	99.82
p33TXLD_00158	PilO	99.30	880	99.76
p33TXLD_00159	PilP	98.66	293	99.33
p33TXLD_00160	PilQ	99.61	1059	99.80
p33TXLD_00161	PilR	98.61	732	99.72
p33TXLD_00162	PilS	97.54	402	99.50
p33TXLD_00163	PilT	100	384	99.46
p33TXLD_00164	PilU	98.62	422	99.54
p33TXLD_00165	PilV	99.18	738	77.21
p33TXLD_00167	TraE	98.90	555	99.63
p33TXLD_00168	TraF	99.74	806	99.74
p33TXLD_00169	TraG	99.48	402	99.48
p33TXLD_00170	TraH	100	319	99.34
p33TXLD_00171	TraI	100	550	99.63
p33TXLD_00172	TraJ	99.47	781	99.73
p33TXLD_00173	TraK	100	196	98.95
p33TXLD_00175	SogL	95.13	2438	99.92
p33TXLD_00176	TraL	100	235	99.13
p33TXLD_00177	TraM	100	480	99.56
p33TXLD_00178	TraN	99.38	655	99.69
p33TXLD_00179	TraO	99.53	875	99.76
p33TXLD_00180	TraP	99.57	479	99.57

ID <i>query</i>	Proteína	ID (%)	Score	Fracción de alineamiento del <i>query</i> (%)
p33TXLD_00182	TraR	99.25	260	99.25
p33TXLD_00184	TraT	99.12	541	99.62
p33TXLD_00185	TraU	99.60	2095	99.90
p33TXLD_00186	TraV	99.51	416	99.50
p33TXLD_00187	TraW	100	817	99.25
p33TXLD_00188	TraX	99.48	3094	99.48
p33TXLD_00189	TraY	84.92	1223	99.86
p33TXLD_00190	ExcA	65.75	291	97.27
p33TXLD_00197	TrbA	99.50	828	99.75
p33TXLD_00198	TrbB	99.43	735	99.71
p33TXLD_00199	TrbC	99.86	1585	99.86
p33TXLD_00200	NikB	99.33	18.63	99.88
p33TXLD_00201	NikA	100	222	99.09
p33TXLD_00202	YggA	100	220	97.34
p33TXLD_00203	YgfB	97.51	577	99.64
p33TXLD_00205	YgeA	98.79	165	98.79
p33TXLD_00207	YgdB	78.91	498	99.67
p33TXLD_00208	YgdA	100	180	98.86
p33TXLD_00209	YgcA	100	304	99.30
p33TXLD_00210	ardA	98.19	340	56,12
p33TXLD_00211	YgaA	98.98	397	98.98
p33TXLD_00212	PsiA	100	485	99.58
p33TXLD_00213	PsiB	98.61	297	99.30
p33TXLD_00214	YfhA	95.70	1273	99.84
p33TXLD_00216	Ssb	99.42	354	99.42
p33TXLD_00217	YffA	96.82	129	98.41
p33TXLD_00218	YfeC	95.71	271	99.28
p33TXLD_00219	YfeB	95.71	271	99.28

ID <i>query</i>	Proteína	ID (%)	Score	Fracción de alineamiento del <i>query</i> (%)
p33TXLD_00220	YfdA	96.87	504	99.60
p33TXLD_00221	YfcB	87.73	186	99.05
p33TXLD_00253	YfbA	94.82	102	56.43
p33TXLD_00252	YfaB	92	578	97.07
p33TXLD_00249	ImpB	98.57	867	99.29
p33TXLD_00250	ImpA	100	297	98.62
p33TXLD_00248	ParB	31.25	45.8	60

Nota: se resalta en negrilla los alineamientos con porcentaje de identidad y/o fracción de alineamiento del *query* <90%.

Apéndice Q. Patrón de resistencia de la cepa 33TXLD y cepas emergentes de *S. Infantis* MDR

<i>S. Infantis</i> 2747	<i>S. Infantis</i> N553391	<i>S. Infantis</i> 119944	<i>S. Infantis</i> 33TXLD
<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
<i>sulI</i>	<i>sulI</i>	<i>sulI</i>	<i>sulI</i>
-	<i>dfrA</i>	<i>dfrA</i>	<i>dfrA</i>
-	-	<i>nfsA</i>	<i>nfsA</i>
<i>aac(6')-Iaa</i>	-	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>aac(6')-Iaa</i>
<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ia</i>	<i>aph(3')-Ia</i>
-	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>	<i>aph(4)-Ia</i>
-	<i>aac(3)-IV</i>	-	<i>aac(3)-IVa</i>
-	-	<i>aadA</i>	<i>aadA</i>
-	<i>gyrA</i> (D87Y)	<i>gyrA</i> (D87Y)	<i>gyrA</i> (D87Y)
<i>gyrA</i> (S83Y)	-	-	-
-	-	-	<i>parC</i> (T57S)
-	<i>bla_{CTX-M-65}</i>	-	<i>bla_{CTX-M-65}</i>
-	<i>floR</i>	-	<i>floR</i>
-	-	-	<i>fosA3</i>
-	-	-	<i>pmrA</i> (S89T, R211G)
-	-	-	<i>pmrB</i> (T18M, S76G, V86I, T114A)
-	-	-	<i>phoP</i> (S131P)
-	-	-	<i>phoQ</i> (T68A)
			<i>pmrC</i> (A159V, V161I, R263L)
			<i>pmrD</i> (L85S)

Apéndice R. Comparación de los genes y sustituciones de resistencia antimicrobiana identificados con los diferentes programas de análisis

Determinantes de resistencia	PointFinder	ResFinder	RGI	ABRicate
<i>gyrA</i> (D87Y)	x		x	
<i>parC</i> (T57S, A620T)	x			
<i>tufA</i> (R234F)			x	
<i>glpT</i> (E350Q)			x	
<i>uhpT</i> (E448K)			x	
<i>aac(6')-Iy</i>		x	x	x
<i>aph(3')-Ia</i>		x	x	x
<i>aadA1</i>		x	x	
<i>aph(4)-Ia</i>		x	x	x
<i>aac(3)-IV</i>		x	x	x
<i>ampH</i>			x	
<i>blaCTX-M-65</i>		x	x	
<i>fosA3</i>		x	x	x
<i>sul1</i>		x	x	x
<i>dfrA14</i>		x	x	x
<i>tet(A)</i>		x	x	x
<i>floR</i>		x	x	x
<i>pmrG</i>				x
<i>bacA</i>			x	
<i>golS</i>			x	x
<i>mdsA</i>			x	x
<i>mdsB</i>			x	x
<i>mdsC</i>			x	x
<i>marA</i>			x	x
<i>sdiA</i>			x	x
<i>acrA</i>			x	

<i>acrB</i>	x	
<i>acrD</i>	x	x
<i>kdpE</i>	x	
<i>mdtA</i>	x	x
<i>mdtB</i>	x	x
<i>mdtC</i>	x	x
<i>mdtK</i>	x	x
<i>crp</i>	x	x
<i>cpxA</i>	x	
<i>msbA</i>	x	
<i>baeR</i>	x	x
<i>baeS</i>		x
<i>emrR</i>	x	
<i>emrB</i>	x	
<i>marR</i>	x	
<i>soxS</i>	x	
<i>soxR</i>	x	

Nota: una x indica la detección del determinante mediante el respectivo programa