



**Genómica comparativa de aislamientos clínicos Colombianos de
Salmonella Typhimurium Variante Monofásica**

Paloma Cuenca Arias

11932013704

Universidad Antonio Nariño
Programa Maestría en Bioquímica
Facultad de Ciencias Básicas
Bogotá D.C, Colombia
2021

**Genómica comparativa de aislamientos clínicos Colombianos de *Salmonella*
Typhimurium Variante Monofásica**

Paloma Cuenca Arias

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Bioquímica

Directora:

Dra. Magdalena Wiesner Reyes

Co-Director:

Dr. Nelson Enrique Arenas

Línea de Investigación:

Investigación en Salud Pública.

Grupo de Investigación:

Grupo de Microbiología- Instituto Nacional de Salud

Universidad Antonio Nariño

Programa de Maestría en Bioquímica

Facultad de Ciencias Básicas

Bogotá D.C, Colombia

Año

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado **Genómica comparativa de aislamientos clínicos Colombianos de *Salmonella Typhimurium* Variante Monofásica**

_____, Cumple

con los requisitos para optar

Al título de Magister en Bioquímica.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Bogotá D.C, 19, 10, 2021.

Contenido

Lista de Figuras	5
Lista de tablas.....	6
Figuras y tablas en Anexos.....	6
Abreviaturas	7
Dedicatoria	8
Agradecimientos.....	5
14. Resumen	7
15. Abstract.....	8
1. Introducción.....	9
2. Planteamiento del problema.	10
3. Marco teórico.....	11
4. Estado del Arte	15
4.1 Mecanismos de virulencia y patogenicidad	15
4.2 Resistencia a antibióticos	16
4.3 Tolerancia a metales pesados	17
5. Hipótesis	18
6. Objetivos.....	18
6.1 Objetivo General	18
6.2 Específicos	18
7. Metodología.....	19
7.1 Aislamientos clínicos y caracterización	19
7.2 Identificación de las regiones del cromosoma deletadas en los diferentes aislamientos de STVM.....	20
7.2.1 Ensamble de genomas	20
7.2.2 Anotación y comparación de las secuencias	20

7.3	Determinación de los genes de virulencia y resistencia.....	20
7.4	Identificación del genoma accesorio	21
8.	Resultados.....	21
8.1	Características generales	21
8.2	Comparación de las secuencias con el genoma referencia.....	22
8.3	Diversidad genética y análisis filogenético del genoma central de SNP	26
8.4	Variación genotípica en proteínas flagelares y operones fimbriales implicados en procesos de invasión, adherencia y motilidad.....	27
9.	Factores de virulencia e Islas de patogenicidad (SPI) en STVM	30
9.1	Factores de virulencia.....	30
9.2	Islas de patogenicidad.....	31
9.3	Búsqueda de profagos	32
10.	Identificación del genoma accesorio	34
10.1	Genes de resistencia a antibióticos.....	34
10.2	Plásmidos	35
10.3	Pangenoma y genoma central	35
11.	Discusión	39
11.1	Análisis Filogenético y plasticidad del genoma.....	39
11.2	Las variantes de STVM albergan diferentes plásmidos, genes de resistencia a antibióticos y elementos genéticos integrativos (ICE).....	40
11.3	Adquisición de plásmidos y plásmido de virulencia propio de <i>S. Typhimurium</i> se encuentra como plásmido híbrido pSTV.....	41
11.2	La ausencia de ciertas proteínas flagelares y factores de virulencia sugiere una colonización intestinal no necesaria como proceso de adaptación al huésped dependiendo la forma de diseminación del patógeno.....	42
12.	Conclusiones.....	44
13.	Recomendaciones	45

14. Bibliografia.....	45
15. <i>Anexos</i>	55

Lista de Figuras

Figura 1. Entorno genómico del profago Fels1 y localización de genes críticos para gaps en el mapeo	24
Figura 2. Entorno genómico del operón <i>fljAB</i> y localización de gaps en el mapeo.....	25
Figura 3. Árbol filogenético de los aislamientos STVM colombianos y clones internacionales	27
Figura 4. Mapa de calor presencia/ausencia operones fimbriales y proteínas flagelares implicados en procesos de invasión, adherencia y motilidad.	28
Figura 5. Cambio de aminoácidos en las proteínas flagelares FliF y FlhD	29
Figura 6. Principales factores de virulencia, Islas genómicas de patogenicidad	31
Figura 7. Distribución de plásmidos, profagos y genes flagelares relacionados con el linaje clonal.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Relación entre resistencia a antibióticos y su perfil fenotípico	35
Figura 9. Representación visual del genoma central y genoma accesorio.....	38
Figura 10. Aislamientos que poseen genes de resistencia a metales pesados.....	39
mico del profago Fels1 y localización de genes críticos para gaps en el mapeo	24

Lista de tablas

Tabla 1. Comparación de genomas de la variante monofásica 21

Tabla 2. Distribución gaps del entorno genómico del operón *fljAB* 24

Tabla 3. Porcentaje del genoma central y genoma accesorio 37

Figuras y tablas en Anexos

Figura Complementaria 1. Matriz basada en longitud y distancias de ramas de la filogenia inferida por SNP 56

Tabla Complementaria 1. Factores de virulencia 55

Abreviaturas

Abreviatura	Término
STVM	<i>Salmonella</i> Typhimurium Variante monofásica
WGS	Secuenciación por genoma completo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDA	Enfermedad diarreica Aguda
ETA	Enfermedad transmitida por Alimentos
H	antígeno flagelar
pSTV	Plásmido de virulencia en <i>Salmonella</i> Typhimurium
NTS	Salmonella no tifoidea
O	antígeno somático O
OMS	Organización mundial de la salud
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
Vi	Antígeno capsular
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
OMP	Proteína de membrana externa
AMR	Resistencia Antimicrobiana
ASSuT	Tetraresistencia a Ampicilina, Estreptomicina, Sulfonamida, Tetraciclina
SGI	Isla genómica de <i>Salmonella</i>

Dedicatoria

A mi familia,

*Quienes siempre me han apoyado en el camino
de la ciencia y la investigación.*

Agradecimientos

Agradezco todo el apoyo recibido por mis tutores la Doctora Magdalena Wiesner Reyes y el Doctor Nelson Enrique Arenas, quienes me han guiado en este proceso de aprendizaje. De igual forma el Doctor José Migue Villareal ha sido un gran mentor en el mundo de la *Salmonella*, elementos genéticos móviles y proteínas.

Me siento muy afortunada por poder ser parte del grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud y contar con la asesoría de Efraín Andrés Montilla y Diego Andrés Prada quienes con sus conocimientos en bioinformática me brindaron orientación en análisis y procesamiento de datos, así como Catering Rodríguez y Sandra Saavedra con sus conocimientos de resistencia antimicrobiana me aclararon varias dudas. Doy gracias a aquellas personas que siempre me han acompañado y animado en estos días de “modo tesis”: Lizeth Ospina, Tatiana Cobos, Zonia Alarcón, Víctor Medina, Patricia Correa, Nancy Flórez y Stefany Botero. Gracias a mi familia por animarme a seguir cuando me sentía agotada y a mi Mamá por ser siempre mi soporte.

Agradecimiento especial a quienes hicieron posible este proyecto: Fondos internos del Instituto Nacional de Salud, Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, programa de vigilancia por laboratorio de Enfermedad Diarreica Aguda y Enfermedad Transmitida por Alimentos. Laboratorios de Salud Pública Departamentales y secretarías Distritales de Salud del país y sus respectivas redes de laboratorios. Proyecto: 10,000 Salmonella Genomes Project. Investigadores: Yan Li, Blanca Perez-Sepulveda, Jay C. D. Hinton,; Filiación: Functional and Comparative Genomics. Institute of Integrative Biology, Biosciences Building y proyecto Colciencias proyecto SIGP 210471250745.

8. Resumen

Salmonella Typhimurium variante Monofásica (STVM) se ha convertido en un problema de salud pública a nivel global, por la sucesiva aparición de clones dominantes y rápida diseminación. En Colombia, el Instituto Nacional de Salud, reporta la circulación de esta variante para el año 2015, posicionada en sexto lugar entre los 20 serovares aislados con mayor frecuencia de *Salmonella spp.* El objetivo del presente trabajo fue caracterizar genotípicamente los aislamientos de STVM colombianos confirmando el tipo de clon circulante a nivel nacional. En el presente estudio se incluyeron los genomas completos de 21 aislamientos clínicos colombianos de STVM, que se analizaron mediante herramientas computacionales y de genómica comparativa. Los resultados sugieren una alta plasticidad genómica en cepas de STVM mediada por la adquisición de elementos genéticos móviles y conjugativos que confieren tolerancia a metales pesados y resistencia a antibióticos. También, se observó la ausencia de genes involucrados en procesos de adhesión, invasión y colonización, reflejando procesos de adaptación de la nueva serovariedad independiente del linaje clonal, fuente u origen geográfico.

Palabras Clave: *Salmonella* Typhimurium, variante monofásica, profago, antibiótico-resistencia, plásmidos, plasticidad genómica, mutaciones, flagelo, secuenciotipo, SPI, SGI

9. Abstract

Salmonella Typhimurium Monophasic variant (STVM), has become a problem in public health globally due to its sudden rise of dominant clones and fast spread. In Colombia, the National Institute of Health reported the circulation of this variant since 2015, ranked sixth among the 20 *Salmonella* serovars isolated with the highest frequency. Our aim was to characterize genotypically the STVM Colombian isolates confirming the clone-type spreading nationwide. In this study, we included a whole-genome sequencing dataset of 21 Colombian clinical isolates of STVM that were analyzed by using bioinformatics and comparative genomics tools. Our results suggest high genomic plasticity in STVM strains mediated by the acquisition of mobile and conjugative genetic elements, conferring heavy metal tolerance and antibiotic resistance. Moreover, the absence of genes involved in adhesion, invasion, and colonization processes suggest an adaptation process of the new serovar, independently of clonal lineage, source, or geographical origin.

Key Words: *Salmonella* Typhimurium, monophasic variant, prophage, antibiotic-resistance, plasmids, genomic plasticity, mutations, flagellum, sequence, SPI, SGI.

Introducción

Salmonella spp. es una de las principales causas de enfermedad diarreica a nivel global; según la organización mundial de la salud (OMS), se estima que una de cada diez personas adquiere este patógeno por ingesta de agua o comida contaminada y anualmente se reportan más de 550 millones de casos (World health Organization, 2018). Su transmisión se da por contaminación fecal-oral de alimentos o agua, y la infección por este patógeno representa un problema considerable tanto en los países en vía de desarrollo como en los desarrollados (Majowicz et al., 2010).

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae de bacilos Gram-negativos, cuenta con dos especies *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* que contiene más de 2600 serovares. *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es uno de los principales serovares y es el agente etiológico de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) originada por intoxicación alimentaria (Barreto, Castillo-Ruiz, & Retamal, 2016).

En *S. Typhimurium* se ha descrito la sucesiva aparición de clones dominantes resistentes a múltiples fármacos, diferenciados por el tipo de secuenciotipo y fagotipo (García, Malorny, Hauser, Mendoza, & Rodicio, 2013; Petrovska et al., 2016). A mediados de la década de 1990, especialmente en Europa y Estados Unidos, surge una serovariedad con gran relevancia epidemiológica denominada *Salmonella Typhimurium Variante Monofásica (STVM)* cuya fórmula antigénica es 1,4, [5], 12: i: -. Esta variante se caracteriza por la falta de expresión del antígeno flagelar de fase 2; presenta resistencia a ampicilina, estreptomycin, sulfonamidas y tetraciclinas (ASSuT) (García et al., 2016; Seixas et al., 2016). Además, esta relacionada con infecciones transmitidas por alimentos como la carne de cerdo, y su alta diseminación a nivel global (Lan, Gaucher, Nhan, Letellier, & Quessy, 2018; Lynch et al., 2017; Weaver et al., 2017).

En Colombia, el programa de vigilancia de enfermedad diarreica aguda (EDA), liderado por el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) realiza la confirmación y caracterización de los aislamientos de *Salmonella spp.* recuperados a partir de muestra clínicas en el país, desde hace más de 20 años. A partir del año 2015 se reportó la circulación de una variante monofásica de *S. Typhimurium* (Montaño V, Sossa U, &

Correa C, 2018), se estima que el 67% de los aislamientos entre los años 2015-2018 (n=174) corresponde a STVM, con ausencia total o parcial del operón *fljAB* que codifica para la segunda fase flagelar. Estos aislamientos muestran resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y ampicilina. Los cambios fenotípicos en algunos de estos clones relacionados con los linajes Europeo/Español y Estadounidense (EE.UU) en muestras de orina sugieren adaptación en procesos invasivos (Cuenca-Arias, Montaña, Villarreal, & Wiesner, 2020). De forma adicional en el 2019 se reportó la circulación del clon epidémico monofásico asociado al linaje clonal Europeo: el secuenciotipo ST34 (Li et al., 2019).

1. Planteamiento del problema.

En los últimos 30 años, se reportó la emergencia de una nueva serovariedad de *Salmonella enterica*, ocupando en Europa el tercer lugar en los programas de vigilancia de *Salmonella* (ECDC, 2014) y en EE.UU ocupa la quinta posición de los serovares más frecuentemente aislados en el país (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018). En Colombia, según los reportes generados por la vigilancia por laboratorio de EDA del INS, los primeros aislamientos identificados como STVM se reportaron en el año 2015 y han incrementado hasta ocupar el cuarto lugar en la vigilancia de serovares (Soyer et al., 2009). En el año 2018, dado el aumento del número de aislamientos del serovar emergente en el intervalo de tiempo de 2015-2018 (n=268), se desarrolló un proyecto titulado: “Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- recuperados en Colombia” (Cuenca-Arias et al., 2020). El proyecto caracterizó fenotípica y genotípicamente 54 aislamientos de STVM. Los aislamientos se confirmaron mediante el esquema de serotipificación Kauffman-White-Le Minor, se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por la prueba de Kirby-Bauer y la prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC), y mediante PCR y secuenciación de genoma completo (WGS) se confirmó la presencia/ausencia del operón *fljAB*.

Como resultado de la caracterización de STVM se encontró que en Colombia circulan 3 clones descritos a nivel internacional, el clon Europeo/Español, el clon atípico y

un clon inconsistente, y algunos aislamientos con características particulares que se definen como clones endémicos. La definición de los clones de STVM se basa en la delección del operón *fljAB*, así como por la delección de otras regiones en el cromosoma, presencia de un genoma accesorio característico de estos aislamientos que incluye genes que confieren resistencia a antibióticos ASSuT. Los aislamientos colombianos caracterizados previamente, deben confirmarse mediante análisis de genomas completos para definir de manera más acertada el tipo de clones circulantes en el país. El objetivo de este proyecto fue analizar el genoma completo de aislamientos clínicos colombianos de STVM descritos en Cuenca-Arias et al, (2020) (Cuenca-Arias et al., 2020) para confirmar los diferentes clones circulantes en el país mediante la identificación de las regiones del cromosoma eliminadas en los diferentes aislamientos, determinación de los genes de virulencia y resistencia, el genoma accesorio.

2. Marco teórico.

Salmonella spp. pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, bacilos Gram-negativos facultativos, caracterizadas por ser oxidasa negativo (Carlos Adelantado, E. Leonardo Arosemena, M^a Angeles Calvo, Luis Manteca, 2008), no fermentadores de lactosa, poseer flagelos peritricos, que les confieren la motilidad y por ser el patógeno responsable de la enfermedad conocida como Salmonelosis: caracterizada por diarrea aguda en ocasiones acompañada de fiebre, vómito y calambres abdominales que se presentan de 12 a 72 horas después de la ingesta de agua o comida contaminada (ruta de infección fecal-oral) (view, 2013).

El género *Salmonella* consta de dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, esta última se encuentra dividida en 6 subespecies: *Salmonella enterica* subespecie *enterica*, *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, *Salmonella enterica* subespecie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* y *Salmonella enterica* subespecie *indica* (Caffer, 2009), distribuidas en más de 2600 serovares que son clasificados mediante el esquema de serotipificación Kauffman-White-Le Minor, el cual consiste en la aglutinación de antígenos que se encuentran en la superficie de la membrana bacteriana: el antígeno capsular o antígeno Vi, antígeno somático

O ó lipopolisacárido y el antígeno H o antígeno flagelar (Grimont & Weill, 2008). El resultado de este esquema es una fórmula antigénica que permite tipificar la gran variedad de serovares de *Salmonella* spp.

Uno de los serovares importantes en salud pública, por ser el principal agente etiológico en casos de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) es *S. Typhimurium* (Barreto et al., 2016) con fórmula antigénica 1,4,[5],12:i:1,2; que posee la capacidad de adaptarse y emplear múltiples mecanismos de defensa para resistir los factores ambientales estresantes, como el pH ácido del estómago, y mecanismos de virulencia que le permiten invadir el epitelio intestinal y diseminarse por todo el hospedador para establecer la infección (Gart et al., 2016). Por ejemplo, para competir entre la microbiota y el huésped después de ingresar a la luz intestinal, *Salmonella* usa sus flagelos para moverse a la proximidad de las células epiteliales intestinales (Bonifield & Hughes, 2003; Fàbrega & Vila, 2013) y con la ayuda de las fimbrias se adhiere a la superficie de las células huésped (Ledeboer, Frye, McClelland, & Jones, 2006).

La expresión de los flagelos está mediada por una variación de fase entre dos genes estructurales conocidos como: *fliC* (fase 1) y *fljB* (fase 2). La variación de fase flagelar es mediada por el operón *fljAB* compuesto por los genes *hin*, *fljA* y *fljB*. El gen *hin* es una ADN invertasa que media la recombinación del operón, actuando como un interruptor molecular, si se encuentra en forma "encendida", se transcriben los genes *fljA* y *fljB*, lo que da como resultado la expresión de flagelina de fase 2 y la inhibición de fase 1 (Ido et al., 2011) ya que la activación del gen *fljA* codifica un regulador negativo que inhibe la expresión de *fliC* mediante control postranscripcional (Tomiyama et al., 2015; Yamamoto & Kutsukake, 2006). Cuando *hin* está en forma "apagada" no se transcriben los genes *fljA* ni *fljB*, lo que permite la expresión de *fliC* dando como resultado únicamente la síntesis de flagelina de fase 1 (Boland, Van Hesse, Mahillon, & Wattiau, 2018). Para finales de la década de los noventa en Europa (Hopkins et al., 2010) llama la atención un incremento en el número de aislamiento de *Salmonella enterica* serovar 1,4,5,12:i:- que carece de la segunda fase flagelar, denominada *Salmonella* variante Monofásica (SVM), asociada con alteraciones en los genes del operón *fljAB* que conducen a la falta de expresión de antígenos flagelares fase 2 incluso si el serovar contiene el gen para la proteína flagelar FljB (Zamperini et al., 2007). En particular, aunque algunos serovares también comparten una fórmula antigénica similar

a SVM, artículos como el de Echeita et al (2001) y Soyer et al (2009) describen una descendencia o evolución a través de múltiples eventos de emergencia independientes de *S. Typhimurium* (Echeita, Herrera, & Usera, 2001; Soyer et al., 2009).

La confirmación del serovar se realiza mediante la PCR de un fragmento de inserción IS200 específico para *S. Typhimurium*, dentro del operón que codifica los genes de flagelina de la primera fase. El fragmento IS200 está situado corriente abajo del gen *fliB* y corriente arriba de la región del gen *fliA*, obteniendo un amplicón de 1000 pb. Ya que este fragmento se encuentra en la misma posición y contiene la misma secuencia en *S. Typhimurium* y SVM se denomina el nuevo serovar como *Salmonella Typhimurium Variante Monofásica* (STVM). STVM es reportada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) entre los cinco serovares más comunes de *Salmonella spp.* (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2018; ECDC, 2014), responsables de infecciones en humanos y animales; la rápida diseminación de este serovar a nivel global ha provocado la emergencia de diferentes clones a través de múltiples eventos independientes (Soyer et al., 2009; Sun, Wan, Du, & Bai, 2020), y el éxito de los clones tiene implicaciones para la vigilancia y el tratamiento de las enfermedades. Los clones de STVM se han caracterizado por la pérdida de regiones genéticas a lo largo del cromosoma bacteriano o por la adquisición de elementos de resistencia a antibióticos y metales pesados (relacionados con un patrón de tetraresistencia ASSuT)(Mourão, Novais, Machado, Peixe, & Antunes, 2015). Estas variaciones son identificadas mediante técnicas como perfiles de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), patrones de análisis de repetición en tándem de número variable de múltiples locus (MLVA) y secuenciación por genoma completo (WGS) (García et al., 2013; Hauser et al., 2010; Sun et al., 2020); (García et al., 2016; Seixas et al., 2016).

La literatura destaca tres linajes clonales (Soyer et al., 2009), el clon Europeo predominante a nivel global), el Español y el Estadounidense.

Los primeros dos clones difieren en el tipo de secuenciotipo ST34 y ST19 respectivamente, ambos son multiresistentes y han perdido la región del operón *fljAB* (Li et al., 2019). El clon EE.UU, presenta sensibilidad a antibióticos y conserva el gen *hin* del operón *fljAB* e *iroB* de su contexto genómico (Soyer et al., 2009). El éxito epidemiológico depende de la ventaja selectiva de los clones, que resultan de su genotipo único, lo que explicaría la

aparición de variantes inconsistentes y clones endémicos que exhiben patrones de delección y rearreglos distintos en el operón *fljAB* (Barco et al., 2014).

El incremento de brotes de STVM evidencia la aptitud de superar a otros serovares *in vivo* (Naberhaus et al., 2019); por ejemplo, en su estudio Crayford et al (2014) afirma que esta variante a pesar de carecer de una fase flagelar, ha conservado su capacidad para adherirse e invadir las células epiteliales intestinales porcinas *in vitro* (Crayford, Coombes, Humphrey, & Wigley, 2014). En otros trabajos de investigación resaltan la formación de biopelículas como una mejora en la capacidad de supervivencia *in vivo* (Seixas, Machado, Bernardo, Vilela, & Oliveira, 2014), o variaciones en la estructura de proteínas de membrana externa (OMP) como una estrategia de camuflaje en macrófagos (Ipinza et al., 2014). La combinación de la formación de biopelículas, presencia de genes y plásmidos de virulencia implicados en la patogenicidad, la resistencia a antimicrobianos y metales pesados, así como modificaciones en la estructura de las OMPs, se podrían combinar/conjugar para proporcionar ventajas selectivas y competitivas a la bacteria.

En Colombia, el programa de vigilancia de EDA, liderado por el Grupo de Microbiología del INS es quien se encarga de realizar el seguimiento de los aislamientos de *Salmonella spp.* en el país. Desde el año 2015 reportan la circulación de una variante monofásica (Montaño V et al., 2018), donde el 67% de los aislamientos entre los años 2015-2018 (n=174) corresponde a STVM relacionados en mayor medida al clon Europeo secuenciotipo ST34 (Li et al., 2019), con ausencia total del operón *fljAB* y menor perfil de resistencia a antibióticos; los cambios fenotípicos en algunos clones, en especial las muestras provenientes de orina sugieren adaptación en procesos invasivos (Cuenca-Arias et al., 2020).

Los datos obtenidos de estos trabajos con aislamientos clínicos Colombianos en colaboración con el proyecto “10.000 *Salmonella* genomes” de la Universidad de Liverpool (Li et al., 2019) aportan a este proyecto un total de 17 genomas completos secuenciados de STVM, con los cuales se realizará un análisis bioinformático de los diferentes clones. Los propósitos de dicha aproximación consisten en dilucidar los cambios en el genoma de STVM, confirmar el/los tipo(s) de clon(es) circulante(s) a nivel nacional e internacional, y conocer el acervo genético de dichos aislamientos en el país.

3. Estado del Arte

Desde los primeros aislamientos de STVM a finales de la década de los 90, su variabilidad genética se ha estudiado por métodos clásicos de tipificación molecular, como PFGE, MLST, fagotipificación, MLVA y microarreglos (Barco et al., 2014; Garaizar et al., 2002; Pornsukarom, van Vliet, & Thakur, 2018); sin embargo este tipo de técnicas no posee el poder de resolución adecuado para discriminar SNP de distintos linajes clonales (Petrin et al., 2019). Así que los avances en secuenciación por genoma completo (WGS) han permitido dilucidar la alta clonalidad de STVM, mediante el estudio de la epidemiología molecular de los patógenos bacterianos comparando la adquisición de elementos genómicos accesorios, determinantes de resistencia a antibióticos y presencia de pseudogenes, entre otros (Ashton et al., 2017; McDermott et al., 2016).

Aunque este serovar comparte características con *S. Typhimurium* debido a su descendencia, exhibe ciertas particularidades fenotípicas, genotípicas y epidemiológicas, asociados con la aparición y expansión de nuevos clones epidémicos de STVM (Sun et al., 2020). Entre los mecanismos de adaptación se encuentran: mecanismos de virulencia (García et al., 2014), resistencia a antibióticos (Mulvey et al., 2013), tolerancia a metales pesados (Mastrorilli et al., 2018), cambios aparentes en la expresión de proteínas de membrana externa (OMP), entre otros (Cuenca-Arias et al., 2017; Ipinza et al., 2014)

3.1 Mecanismos de virulencia y patogenicidad

En comparación con *S. Typhimurium*, STVM conserva las islas de patogenicidad de *Salmonella* SPI-1 a SPI-5 y SPI-7 (Petrovska et al., 2016), las islas de profagos adquiridas horizontalmente *Gifsy-1*, *Gifsy-2* y *Gifsy-3* (Hauser et al., 2010). Ausencia de genes como *hldD* _ DT104 , *irsA* y *sopE1* alojados en profagos, y *rck* en el plásmido de virulencia (Crayford et al., 2014; Seixas et al., 2016). STVM con frecuencia alberga casetes del sistema toxina-antitoxina (TA) los cuales intervienen en una amplia gama de funciones biológicas,

incluido el control del crecimiento, la defensa contra fagos y la formación de biopelículas (Di Cesare et al., 2016).

En *Salmonella* la formación de biopelículas facilita la infección en gran variedad de hospederos y la supervivencia en el medio ambiente, la variante monofásica conserva los genes *adrA*, *csgD* y *gcpA* responsables de la formación de biopelículas (Ledeboer et al., 2006; Seixas et al., 2014) .

3.2 Resistencia a antibióticos

Los distintos linajes clonales de STVM exhiben diferentes patrones de resistencia a múltiples fármacos, el clon Europeo cuenta con resistencia a ampicilina, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina (ASSuT), cuyos genes se encuentran localizados en una isla de resistencia insertada en el cromosoma y carecen del plásmido de virulencia pSLT típico de *S. Typhimurium*, perteneciente al grupo de incompatibilidad FII (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010). Así mismo, se ha reportado la presencia de los genes *blaTEM 1*, *strA-strB*, *sul2* y *tetB* responsables del perfil tipo ASSuT, localizados en plásmidos IncH1 (García et al., 2016). Mientras el clon Español por lo general en adición presenta resistencia a cloranfenicol, gentamicina y trimetoprima (ACGS/SSuTeT o variantes de la misma) en plásmidos de incompatibilidad IncA/C (García et al., 2014), responsables de la resistencia a múltiples fármacos en patógenos bacterianos cuyo nicho comprende tanto humanos como animales y, por lo tanto, se consideran una amenaza importante para la salud pública. La presencia de estos genes evidencia una evolución a corto plazo, que podría estar implicada en la adaptación exitosa de este patógeno (García, Guerra, Bances, Mendoza, & Rodicio, 2011). Además en STVM linaje clonal Español se ha reportado la presencia de un integrón de clase 1 que alberga casetes de genes como *dfrA12* y *aadA2* y genes *bla TEM-1*, *aac (3)-IV*, *cmlA1* y *tetA* localizados en plásmidos grandes de aproximadamente 140 kb o 120 kb (Guerra, Soto, Argüelles, & Mendoza, 2001). Elnekave et al., (2018) reporta resistencia a quinolonas y la activación de tres mecanismos de resistencia: mutaciones en los genes *gyrA-gyrB* y pares de genes *parC-parE*, genes *PMQR* adquiridos y expresión alterada de bombas de flujo y canales de difusión de porina (Elnekave et al., 2018). Se ha reportado en Australia

la presencia del reciente gen de resistencia a la colistina *mcr-3* en el clon ST34 (Arnott et al., 2018).

3.3 Tolerancia a metales pesados

La propagación de resistencias a metales pesados se relaciona con su uso extensivo como complementos en la dieta de animales de engorde, las grandes cantidades de cobre y zinc favorecen el crecimiento animal y limitan el uso de antibióticos (Petrovska et al., 2016). Los genes de resistencia a metales pesados y resistencia antimicrobiana pueden coexistir en el mismo elemento genético contribuyendo a su rápida diseminación como ha descrito Ammendola *et al.* (2016) que sugiere que la motilidad de *Salmonella* está modulada por la disponibilidad de zinc y también que: “*la capacidad para enfrentar entornos caracterizados por contenidos metálicos variables puede contribuir al control de la expresión de flagelos en cepas monofásicas*”.

Se han descrito cepas con genes de resistencia al cobre (*pcoA - pcoD*) y plata (*silA - silE*) por Mastrorilli et al. (2018), que suponen la promoción a diversas adaptaciones ambientales. Además, se ha demostrado que el cobre está involucrado en la defensa de los macrófagos contra las infecciones por *Salmonella* (Achard et al., 2012),(Ladomersky et al., 2017) destacando el beneficio aptitudinal del mecanismo de los genes *sil/pco* al proporcionar beneficios a los organismos patógenos.

4. Hipótesis

Los aislamientos colombianos de STVM presentan diferencias en las regiones cromosomales deletadas en el genoma y en el genoma accesorio, con respecto a las cepas referencias internacionales.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Comparar los genomas de aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica estableciendo sus diferencias genotípicas.

5.2 Específicos

- Determinar la ganancia o pérdida de genes en los diferentes aislamientos de *Salmonella* Typhimurium Variante Monofásica
- Caracterizar *in silico* los genes de virulencia y resistencia los diferentes aislamientos de *Salmonella* Typhimurium Variante Monofásica Colombianos
- Determinar el genoma accesorio entre los diferentes clones que circulan en Colombia con respecto a lo que circula a nivel internacional

6. Metodología

7.1 Aislamientos clínicos y caracterización

Los aislamientos de STVM se obtuvieron a través de la vigilancia por el laboratorio EDA del INS, durante el periodo comprendido entre los años 2015 a 2018. Los aislamientos clínicos provienen de muestras de materia fecal, hemocultivo y orina. Se obtuvieron 14 secuencias completas de aislamientos de STVM provenientes de hemocultivos, gracias al proyecto en colaboración entre el INS y la Universidad de Liverpool titulado “10.000 *Salmonella* genomes”.

El ADN genómico se obtuvo mediante extracción con el MagAttract kit (Qiagen) y la secuenciación con Illumina HiSeq4000 (Li et al., 2019). Los metadatos de los aislamientos se resumen en la Tabla 1 (numerados del 10-23), que incluye el número de acceso (Sequence Read Archive Accession Numbers), código en el proyecto, fecha de recolección, ubicación geográfica, perfil de resistencia a antibióticos y linaje clonal previamente descrito en Cuenca-Arias et al (2020). Adicionalmente, se obtuvieron tres secuencias por WGS de los aislamientos numerados en la tabla 1 como 6, 7 y 9 (Cuenca-Arias et al., 2020): dos de orina y uno de materia feca; Todos los aislamientos incluidos en este estudio fueron previamente serotipificados por el método de aglutinación del antígeno flagelar usando el esquema de Kauffman-White-Le minor (Grimont & Weill, 2008). La resistencia antimicrobiana (AMR) se determinó mediante la prueba de Kirby-Bauer y la prueba de concentración mínima inhibitoria (MIC) usando plataformas semi-automatizadas MicroScan y Vitek 2, siguiendo los estándares del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio de EEUU (CLSI). Los antimicrobianos evaluados fueron ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, tetraciclina, gentamicina, amikacina, ácido nalidíxico, trimetoprima, ciprofloxacina, ceftazidima y cefotaxima.

7.2 Identificación de las regiones del cromosoma deletadas en los diferentes aislamientos de STVM

7.2.1 Ensamble de genomas

Los genomas bacterianos fueron re-ensamblados *de novo* a partir de los “reads” originales, empleando el programa Geneious 2021.2.1. La anotación de los genomas se realizó empleando la herramienta de “Rapid Annotation using Subsystem Technology, RAST” version 2.0. Los genomas nuevos se depositaron en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

7.2.2 Anotación y comparación de las secuencias

La comparación de los genomas y análisis filogenéticos se realizó alineando los “contigs” contra los genomas de referencia: *S. Typhimurium* LT2 (Accession number: AE006468) y los clones STVM de origen Español (Accession number: DRR106818), Europeo (Accession number: ERR985368) y Estadounidense (Accession number: ABAO01000000) en el programa Geneious Prime v2021.2.1.

La construcción del árbol filogenético y la evaluación de los SNPs se realizó utilizando el programa CSI Phylogeny 1.4 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>), con las siguientes condiciones predeterminadas por el programa: profundidad mínima en posiciones SNP: 10, profundidad relativa en posiciones SNP: 10, distancia mínima entre SNP: 10, calidad mínima de SNP: 30, calidad de mapeo de lectura mínima: 25, puntuación Z mínima: 1,96.

7.3 Determinación de los genes de virulencia y resistencia

Los genes de virulencia se determinaron con los programas SPIs Finder y Virulence Finder disponibles en el servidor del Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) para búsqueda de islas de patogenicidad y factores de virulencia, comparados con la herramienta ABRicate para detección masiva genes antimicrobianos y de virulencia en contigs disponible en la plataforma web Galaxy Versión

1.0.1 (<https://usegalaxy.org/>). Con el programa **PHASTER** (**PH**Age Search **T**ool **E**nanced **R**elease) (<http://phaster.ca/>) se identificaron las regiones de profagos. Los genes de resistencia se determinaron con los programas CARD y ResFinder (Bortolaia et al., 2020).

7.4 Identificación del genoma accesorio

Se realizó una nueva anotación con el programa PROKKA, para obtener los ensamblados anotados en GFF3. Este formato se utiliza como insumo en el programa ROARY para identificar el pangenoma de los aislamientos (programas disponibles en Galaxy Versión 1.0.1 (<https://usegalaxy.org/>)). La visualización del pangenoma se realizó con el programa PHANDANGO. Se identificaron los grupos de incompatibilidad de plásmidos con el programa PlasmidFinder y los elementos genéticos móviles con el programa MobileElementFinder alojados en el sitio web del Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

10. Resultados

10.1 Características generales

Las características genómicas de las STVM ensambladas se resumen en la Tabla 1. Los aislamientos tienen tamaños de genoma (~4,95 Mb) y contenidos de GC similares (52,10%). Se observó un ligero incremento en el tamaño del genoma para la muestra 006 (5,46 Mb), lo que sugiere la presencia de múltiples plásmidos de varios tamaños y elementos repetidos únicos (6, 7). La calidad de los 21 genomas es buena y el número predicho de proteínas fue similar entre los aislamientos secuenciados, la cepa de referencia y los clones de STVM (ver Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de genomas de la variante monofásica

Código	No. de contigs	longitud del genoma (Mb)	%GC	No. proteínas	Número de acceso SRA	Origen de muestra
--------	----------------	--------------------------	-----	---------------	----------------------	-------------------

001	53	4,95	52,13	5035	SRR16287639	Materia Fecal
002	53	4,92	52,13	4989	SRR16287638	Materia Fecal
003	71	5,07	52,10	5183	SRR16287637	Hemocultivo
006	265	5,46	51,99	5780	SRR16287636	Materia Fecal
007	188	5,29	52,21	5521	SRR16287635	Orina
008	101	4,87	52,20	4930	SRR16287641	Hemocultivo
009	242	5,20	52,27	5413	SRR16287640	Orina
010	104	4,93	52,09	5097	SRR8740456	Hemocultivo
011	95	4,93	52,16	5048	SRR8740455	Hemocultivo
012	188	4,91	52,05	5184	SRR8740452	Hemocultivo
013	79	4,86	52,15	4956	SRR8740488	Hemocultivo
014	113	4,92	52,10	5013	SRR8740487	Hemocultivo
015	185	4,82	52,01	5055	SRR8740503	Hemocultivo
016	200	4,80	52,05	5013	SRR8740534	Hemocultivo
017	372	4,88	51,98	5355	No aplica.	Hemocultivo
018	168	4,74	52,08	4900	SRR8740536	Hemocultivo
019	410	4,88	51,91	5439	No aplica.	Hemocultivo
020	359	4,88	51,91	5381	No aplica.	Hemocultivo
021	147	4,81	52,14	4992	SRR8740431	Hemocultivo
022	160	4,75	52,07	4931	SRR8740430	Hemocultivo
023	238	4,90	51,94	5230	SRR8740429	Hemocultivo
EEUU	113	4,90	52,30	4975	ABAO00000000	Sin dato
Español	2	5,10	52,16	5393	DRR106818	Sin dato
Europeo	1	5,04	52,17	5107	ERR985368	Sin dato
LT2	2	4,95	52,20	4972	AE006468	

SRA: Sequence Read Archive

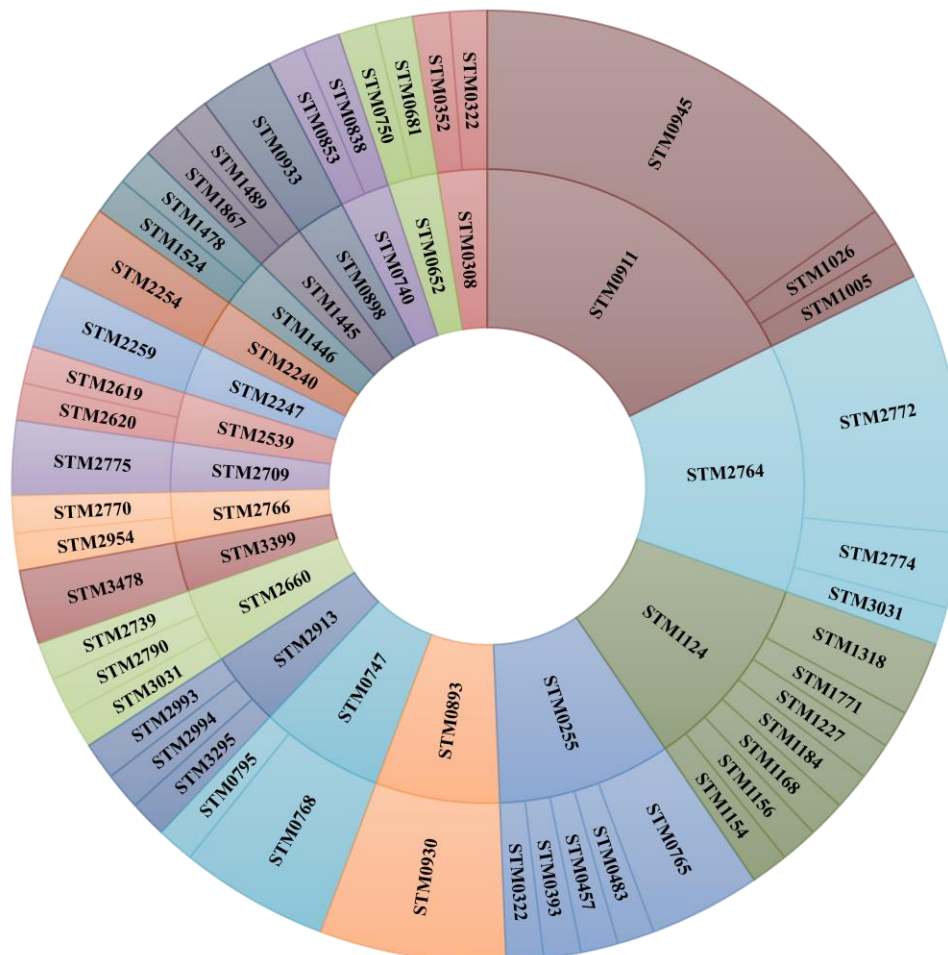
10.2 Comparación de las secuencias con el genoma referencia.

Al realizar el alineamiento de las secuencias con respecto a la cepa de referencia se observó que los gaps que se comparten en mayor proporción en las 21 secuencias corresponden a los genes identificados como STM0911-STM1005, STM2764-STM3031, STM1124-STM1318, STM0255-STM0765, STM893-STM930, STM0747-STM795 en el genoma de referencia LT2 y 14 regiones más, que se pueden apreciar en la Grafica 1. Gran

parte de estos gaps corresponden a regiones del fago Fels-1 y regiones cercanas al entorno genómico del operón *fjlAB* (Figura1).

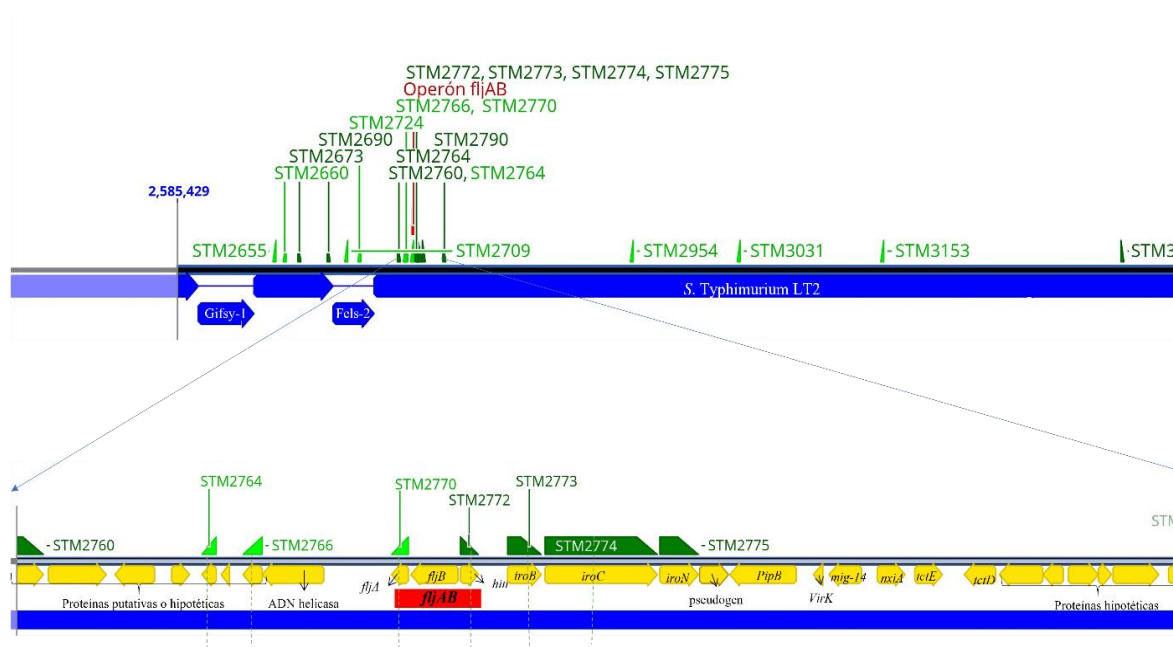
El 66% (n=14) de los aislamientos comparten un gap entre el gen STM0911 hasta STM1005 y representa una delección de 94pb, 5 aislamientos (23,8%) entre los genes STM0893 a STM0930 y 2 (9,5%) entre STM0898 a STM0933 como se puede observar en la Figura 1, estos gaps están situados en la región del fago Fels-1 y parte de Gifsy-2, fagos propios de *S. Typhimurium* LT2.

Grafica 1. Gaps compartidos entre los 21 aislamientos de STVM colombianos con respecto a la cepa de referencia LT2



El anillo interno de la gráfica muestra el gen de inicio, y el externo representa el número de aislamientos que comparten el mismo gap diferenciados por colores

Figura 2. Entorno genómico del operón *fljAB* y localización de gaps en el mapeo



La figura muestra un acercamiento al entorno genómico del operón *fljAB*. Las flechas azules corresponden a el cromosoma de la cepa de referencia *S. Typhimurium* LT2. En amarillo las proteínas anotadas, en verde la posición de los genes donde empiezan o terminan los gaps y en rojo se resalta el operón *fljAB*. En la parte superior de la figura se observa la región del cromosoma de LT2 de 4,95 Mpb donde se representa la ubicación de los profagos *Gifsy-1* y *Fels-2*, el operón *fljAB* y los genes desde el STM2655 al STM3352. En la parte inferior se realizó un diagrama que muestra la sección desde los genes STM2760 al STM2790 donde se resalta la posición del operón *fljAB* y las deleciones observadas en los aislamientos alrededor de este operón.

Total genes por GAP	4	8	12	10	66	100	130	181	188	299	267	371	429	679
----------------------------	----------	----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

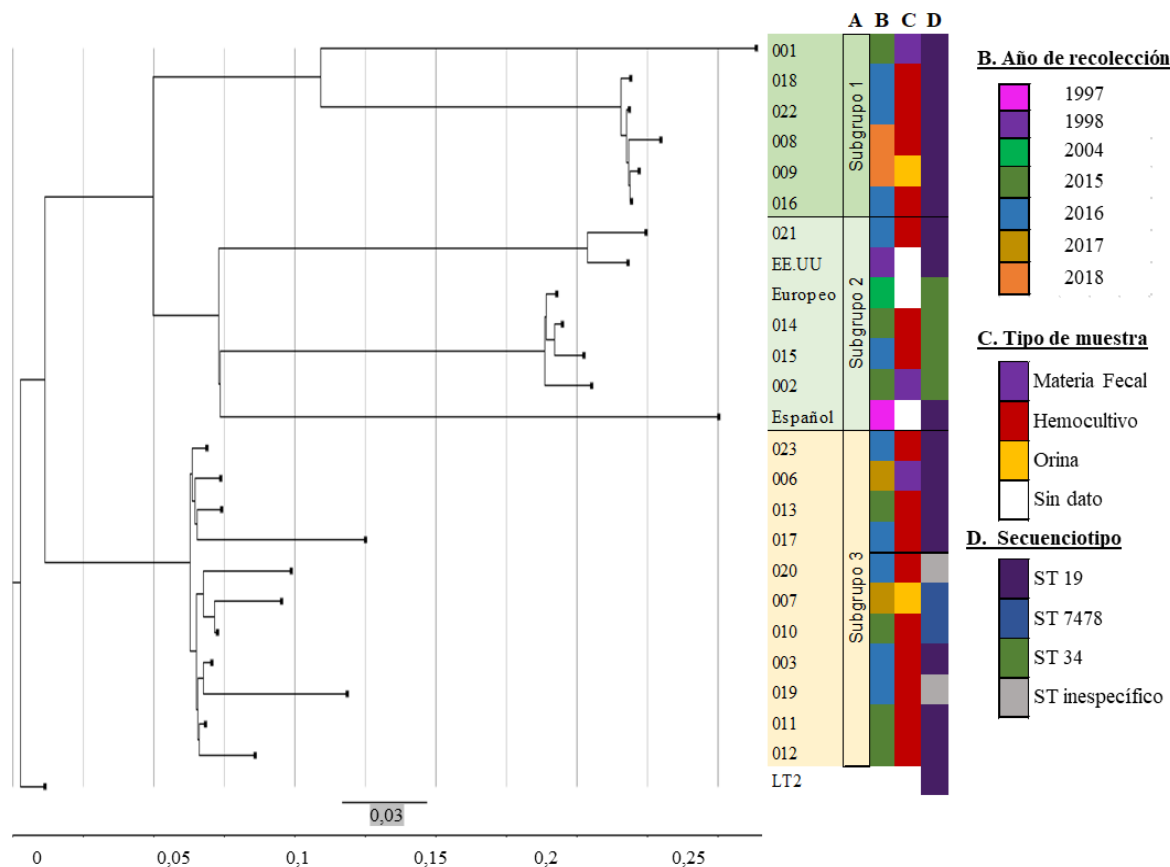
El total general es de 22 ya que la secuencia del aislamiento 007 presenta 2 gaps

10.3 Diversidad genética y análisis filogenético del genoma central de SNP

El porcentaje del genoma de referencia cubierto por todos los aislamientos fue 85.0%. Se encontraron 727.293 SNPs al comparar los 21 aislamientos de STVM, las cepas de referencia de los clones Español, Europeo y EE.UU contra el genoma de referencia LT2 (AE006468). Dieciséis aislamientos fueron secuenciotipo ST19, 4 aislamientos ST34, 2 aislamientos ST7478 y 2 fueron ST indeterminado, junto a estos resultados, el análisis de gaps y los datos obtenidos en el trabajo anterior detallado en Cuenca-Arias *et al*, 2020 se realizó una clasificación del linaje clonal (Cuenca-Arias *et al.*, 2020). La relación filogenética reveló dos grupos principales, cada uno con 2 subgrupos, sin relación con el año de recolección ni tipo de muestra. El grupo 1 incluye el 47,6% (n=10) de los aislamientos mientras el grupo 2 el 52,4% (n=11), cada grupo contiene un aislamiento proveniente de orina 009 y 007 respectivamente (Figura 3).

El subgrupo 1 está conformados por aislamientos ST19 pero los resultados sugieren que son de linajes clonales diferentes. El subgrupo 2 con el ST34 y el subgrupo 3 presenta diversidad de secuenciotipos donde aparece el ST7478 (Figura 3).

Figura 3. Árbol filogenético de los aislamientos STVM colombianos y clones internacionales



Árbol filogenético construido a partir de SNPs, con LT2 como raíz. Se observan dos grupos principales y 3 subgrupos (A), relacionados con el año de recolección (B), tipo de muestra (C) y secuenciotipo (D). En la parte inferior se encuentra la escala de las longitudes de las ramas.

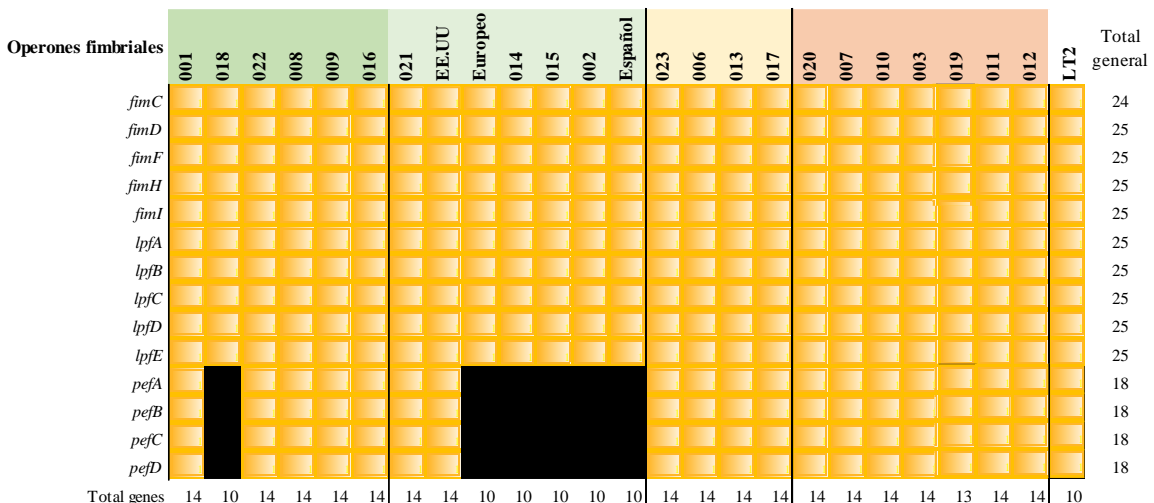
10.4 Variación genotípica en proteínas flagelares y operones fimbriales implicados en procesos de invasión, adherencia y motilidad

Se analizó la presencia/ausencia de 14 proteínas de los operones fimbriales *lpf*, *fim* y *pef*, cuyo papel está descrito en la adhesión e invasión de líneas de células epiteliales (Bäumler, Tsohis, & Heffron, 1996). También se incluyó la búsqueda de genes del operón *fljAB* que codifica la segunda fase flagelar y 43 proteínas flagelares importantes en el proceso de ensamblaje del complejo flagelar. En general, se observa que los aislamientos conservan la mayoría de los operones fimbriales y genes flagelares, con las siguientes

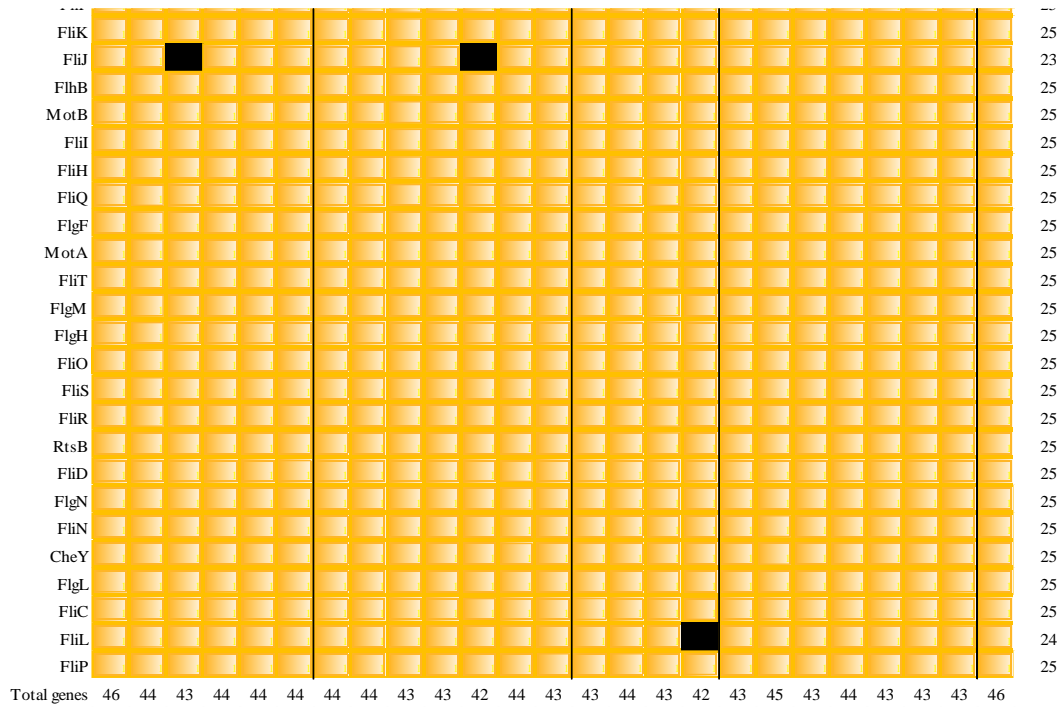
excepciones: el operón fimbrial *pefABCD*, está ausente en 3 aislamientos del subgrupo 2, de forma similar a los clones Europeo y Español, así como el aislamiento 018 en el subgrupo 1 (Figura 4A). Respecto a las proteínas flagelares, se observa que en casi todos los aislamientos el operón *fljAB* está completa o parcialmente eliminado, característica principal en los aislamientos STVM. En el subgrupo 1 los aislamientos conservan el del operón *hin*, características del clon estadounidense en los subgrupos 2 y 3 la mayoría de los aislamientos no porta ningún gen del operón y también carecen de *IroB*. Se hace evidente la ausencia de la proteína FliJ en dos aislamientos y FliL en uno llama la atención, ya que son proteínas involucradas en eventos quimiotácticos (Figura 4B).

Figura 4. Mapa de calor presencia/ausencia operones fimbriales y proteínas flagelares implicados en procesos de invasión, adherencia y motilidad.

A.



B.



La presencia se indica con el recuadro de color amarillo, mientras que la ausencia con color negro, clasificado por los grupos arrojados de la filogenia

También se observaron mutaciones puntuales en la proteína FliF en 3 aislamientos, quien presentan un cambio A353T que podría representar cambios en la estructura del anillo flagelar o dificultades en el ensamblaje. El aislamiento 001 presenta un aparente cambio en el marco de lectura en *FlhD*, el cual activa la expresión de genes flagelares (Figura 5).

Figura 5. Cambio de aminoácidos en las proteínas flagelares FliF y FlhD

A. Proteína FliF



B. Proteína FlhD

001/1-116	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R R K G H D N E
003/1-113	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R K K R A . . .
002/1-113	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R K K R A . . .
spain/1-113	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R K K R A . . .
str/1-113	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R K K R A . . .
L72/1-113	L G I N E E M A N T L G A L T L P Q M V K L A E T N Q L V C H F R F D D H Q T I T R L T Q D S R V D D L Q Q I H T G I M L S T R L L N E V D D T A R K K R A . . .

A) Mutaciones en la proteína *FliF* cambio A353T. B) posible cambio en el marco de lectura en *FlhD* en el aislamiento 001

11. Factores de virulencia e Islas de patogenicidad (SPI) en STVM

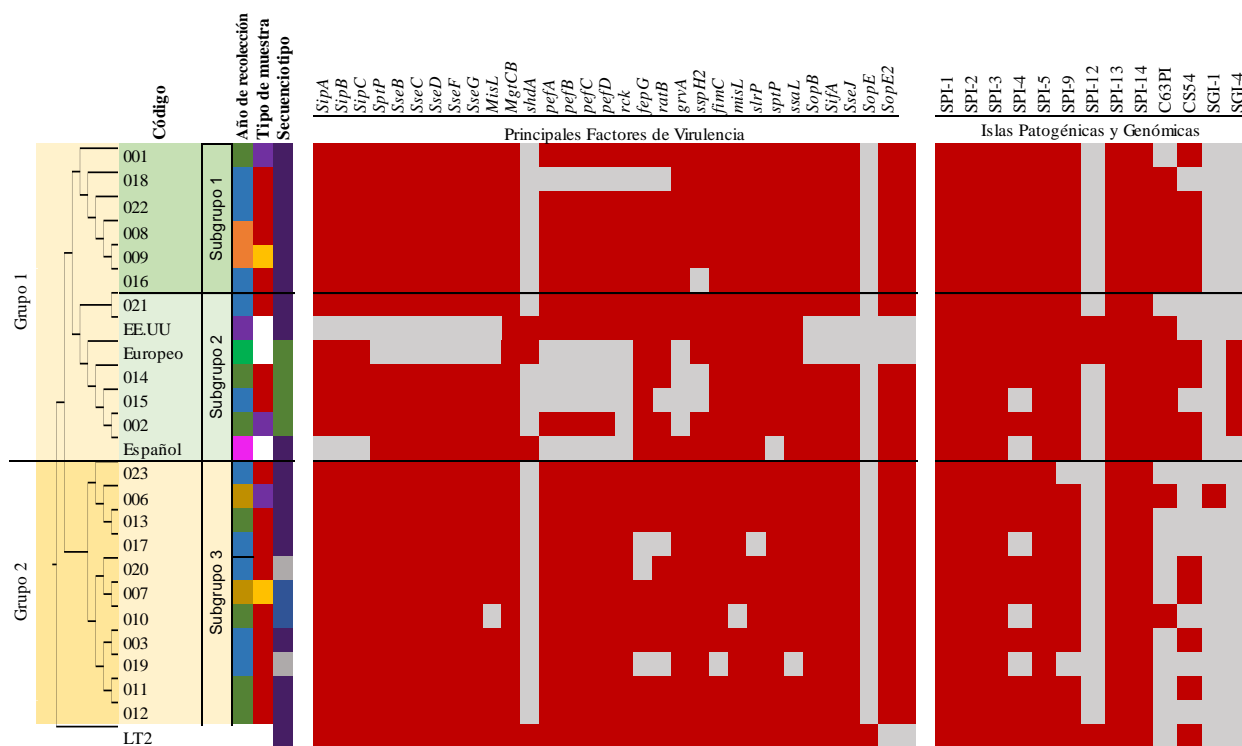
Con el fin de identificar características genómicas asociadas a virulencia en STVM, se realizó una búsqueda de factores de virulencia e islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPI), ya que juegan un papel importante en la interacción entre la bacteria y las células huésped al promover la invasión en las células epiteliales.

11.1 Factores de virulencia

Los factores de virulencia se buscaron y compararon por dos plataformas (Patric y ABRicate) empleando la base de datos VFDB se detectaron un total de 112 factores de virulencia (ver tabla suplementaria 1). De estos, 95 factores de virulencia se conservan en el 100% de los aislamientos y 13 de estos, llaman la atención al estar ausentes en algunos aislamientos (Figura 6). Los aislamientos 015, 017, 018, 019 y 023 de hemocultivo carecen del gen *ratB* productor de una proteína de membrana externa implicada en procesos de adherencia. Se hace evidente la carencia de efectores del sistema de secreción tipo III (T3SS) como el gen *sspH2* en los aislamientos 014, 015, 016 o *sptP* en el Clon EE.UU, *slrP* en el

aislamiento 017, los genes *sseABIK* que codifican chaperonas del T3SS en los aislamientos 008, 013 y 019 (Figura 6) al igual que los genes *ssaLN* en 017 y 019.

Figura 6. Principales factores de virulencia, Islas genómicas de patogenicidad



Mapa de calor donde se relaciona los principales factores de virulencia, a presencia de las SPI y SGI junto a los genes de resistencia a metales proporcionado por el Pangenoma.

11.2 Islas de patogenicidad

Se detectaron 9 de 23 SPI conocidas en *Salmonella*. Los 21 aislamientos STVM colombianos portan 6 SPIs, incluidos SPI-1, 2, 3, 5, 13, 14; y 17 de estos portan SPI-4 al igual que los clones EE.UU y Europeo. La SPI-9 se encuentra en 19 aislamientos de forma similar a los 3 linajes clonales de referencia. SPI-12 solo se detectó en la cepa de referencia LT2 y en los aislamientos de los clones EE.UU y Europeo. La isla CS54 propia de *S.*

Typhimurium está presente en 10 aislamientos. Se observó que dentro del mismo subgrupo los aislamientos comparten un perfil de SPIs similar (Figura 6).

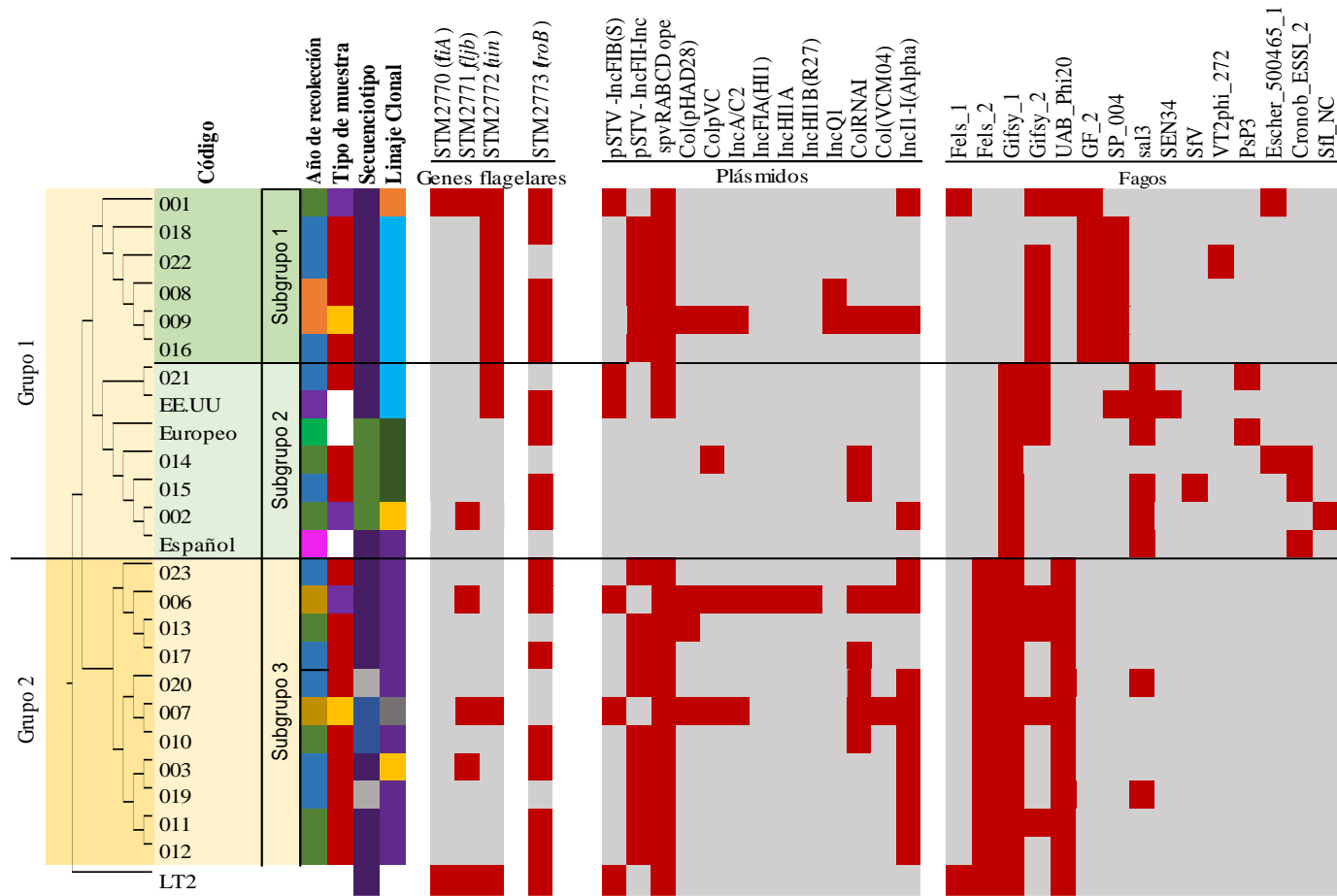
Resalta la presencia de una isla genómica SGI-4 en los aislamientos 002, 014 y 015. En el aislamiento 006 la presencia de la isla genómica SGI-1 que confiere multidrogo-resistencia, la cual es una característica del clon DT104 del serovar Typhimurium (60) y la presencia del locus C63PI (locus de profago ST104) en 10 aislamientos incluido el 006 (61).

11.3 Búsqueda de profagos

Los resultados arrojados por PHASTER como intacto o cuestionable se tuvieron en cuenta. Se identificaron 14 regiones de profagos donde se encuentran los profagos propios de *S. Typhimurium* Fels1, Fels2, Gifsy1, Gifsy2 y otros profagos como UAB_Phi20, GF2, SP004, sal3, SEN34, SfV, VT2phi272, PsP3, 500465_1, ESS12, Sfl_NC. El 9.5% (n=2) de los aislamientos STVM colombianos conservan el profago Fels1, 57.12% (n=12) conservan Fels2, el 76.2% (n=16) conservan Gifsy1 y el 52.4% (n=11) conservan el profago Gifsy2.

Encontramos que el profago UAB_Phi20 es de la familia de los profagos P22, presente en 13 aislamientos de los cuales el 92.3% se encuentran en el subgrupo 3 asociados al clon Español. Los profagos GF2 y SP004 se relacionaron con el subgrupo 1 y el linaje clonal EE.UU presentes en 6 (28.6%) y 5 (23.8%) aislamientos respectivamente. El profago sal3 se agrupa en el subgrupo 2 presente en 23.8% (n=5) de aislamientos colombianos y los tres linajes clonales de referencia. Los profagos SEN34, SfV, VT2phi_272 y Sfl_NC se identificaron solo en 4 aislamientos: Clon EE.UU, 015, 022 y 002, respectivamente. Por ultimo los profagos PsP3, 500465_1, ESS12 se agrupan en su mayoría en los aislamientos del subgrupo 2 como se puede observar en la Figura 7.

Figura 7. Distribución de plásmidos, profagos y genes flagelares relacionados con el linaje clonal



Mapa de calor donde los cuadrados en rojo indican presencia y en gris ausencia del determinante genético. En los genes flagelares se muestran los tres genes del operón *fljAB* y el gen contiguo al operón que algunos casos también es deletado.

12. Identificación del genoma accesorio

12.1 Genes de resistencia a antibióticos

Se identificaron un total de 19 genes de resistencia que pertenecen a 8 familias de antibióticos: tetraciclinas (14 aislamientos), fenicoles (11 aislamientos), beta-lactámicos (6 aislamientos), trimetoprim (2 aislamientos), sulfonamidas (4 aislamientos), aminoglucósidos (21 aislamientos), quinolonas (12 aislamientos), lincosamidas (1 aislamiento).

Se encontraron 3 genes de resistencia a Tetraciclinas *tetA*, *tetB*, *tetM*; donde *tetB* se encuentra en mayor proporción en el grupo 1; *tetA* es asociado al grupo 2 y *tetM* se encuentra solo en el aislamiento 006. Entre los 21 aislamientos, 11 portan genes de resistencia a fenicoles, los genes *floR* y *cmlA1* se encontraron combinados en 2 aislamientos (006 y 007), los restantes 9 aislamientos sólo portan *floR* relacionado con el grupo 2. Se identificaron, 5 genes de resistencia a beta-lactámicos *bla_{SHV-5}*, *bla_{OXA-2}*, *bla_{CTX-M-12}*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-36}* en 8 aislamientos, de los cuales *bla_{TEM-1B}* es el predominante en el 38.1% de las muestras. En 4 aislamientos están presentes los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2*, *sul3* solos o los 3 genes. De los 21 aislamientos sólo 3 aislamientos portan el gen de resistencia a trimetoprim *dfrA8*.

En todos los aislamientos se encontró el gen *aac(6')-Iaa* que codifica un aminoglucósido N-acetiltransferasa, que confiere resistencia a kanamicina y amikacina. De esta misma familia, también se identificaron los genes *aph(3'')-Ib* y *aac(6')-Iaa* en 4 aislamientos, *aac(3)-Iia* (n=3), *aph(6)-Id* en 5, *aadA2* en 6, y *aac(3)-Iid* solo en el aislamiento 008. Se identificó el gen *qnrB19* de resistencia a quinolonas en 8 aislamientos y una mutación S83F en el gen *gyrA* en 5 aislamientos. Resalta la presencia del gen *lnu(F)* en el aislamiento 006 que media la resistencia a lincosamida (Figura 8).

Los genes de resistencia encontrados en este estudio correlacionan con el perfil de resistencia observado en los aislamientos. Es así como el aislamiento 006 que mostró MDR a 7 familias de antibióticos, presenta 20 genes de resistencia.

12.2 Plásmidos

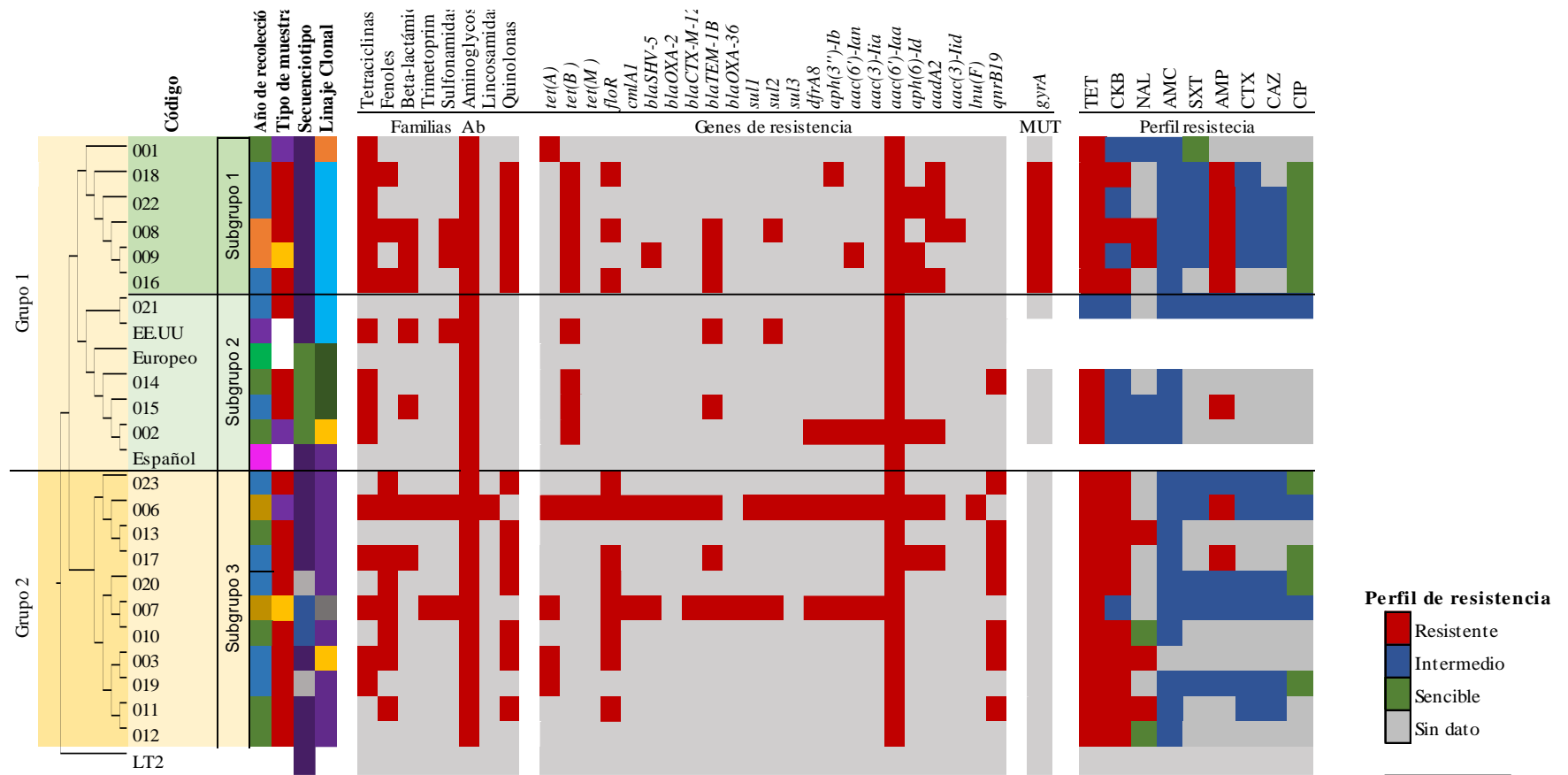
Se identificaron grupos de incompatibilidad que corresponden al plásmido de virulencia de *Salmonella* Typhimurium-pSTV, a plásmidos de resistencia de gran tamaño y a plásmidos pequeños. Con respecto al pSTV, se identificó el grupo de incompatibilidad IncFIB que sugiere la presencia del plásmido criptico en 4 aislamientos, mientras que 14 aislamientos mostraron los grupos IncFII-IncFIB que corresponden a un plásmido conocido como pSTV híbrido. Los 3 aislamientos del subgrupo 2 negativos para estos tres grupos de incompatibilidad también mostraron ausencia del operón de virulencia *spv*, el cual es portado en estos plásmidos. Este resultado confirma que estos aislamientos carecen del pSTV. Adicionalmente, se encontraron plásmidos de resistencia que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncA/C2, IncFIA(HI1), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncQ1, IncI1-I(Alpha) y los plásmidos pequeños como Col(pHAD28), ColpVC, ColRNAI y Col(VCM04) (Figura 7). Los aislamientos 006, 007 y 009 mostraron más de 3 grupos de incompatibilidad, lo que sugiere la presencia de múltiples plásmidos en un mismo aislamiento.

12.3 Pangenoma y genoma central

El análisis del Pangenoma se realizó mediante la herramienta Roary con un límite de identidad porcentual de BLASTp del 95%, para agrupar los genes del genoma central y accesorios (Page et al., 2015), y para la construcción de un nuevo árbol filogenético basado en la alineación de genes centrales (Figura 8).

Como resultado se identificaron 6887 proteínas homologas entre los 21 aislamientos. El genoma central consta de 3346 proteínas (48.6%), y el genoma accesorio de 3541 proteínas (51.4%), donde 634 (9.2%) proteínas se encuentran entre el 95% al 99% de los genomas. Una proporción de los genomas (del 15% al 95%) comparten 1287 proteínas (19%) y 1620 (23.5%) se comparten en un conjunto mínimo de genomas entre 0% a 15% como se puede ver en la Tabla 3.

Figura 8. Relación entre resistencia a antibióticos y su perfil fenotípico



Mapa de calor donde los cuadrados en rojo indican presencia y en gris ausencia del determinante genético. A mano derecha se describen los colores que presenta la relación de genes de resistencia a antibióticos y su perfil fenotípico.; TET: tetraciclina, CKB (CHL): cloranfenicol; NAL: ácido nalidíxico; AMC: ácido clavulánico; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina

Tabla 3. Porcentaje del genoma central y genoma accesorio

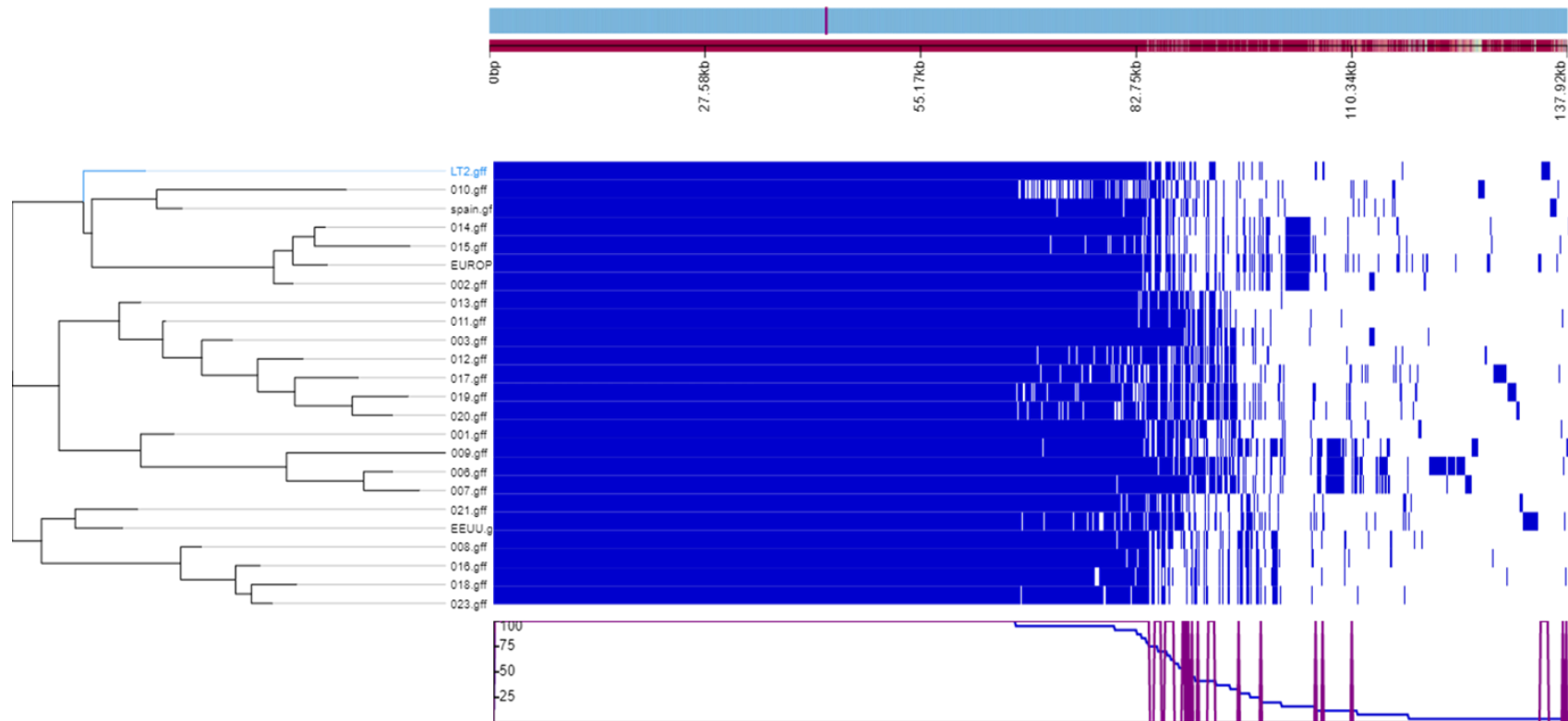
Genoma	Porcentaje en genomas presentes	Número de proteínas	Porcentaje
Genoma Central	99% < Genomas < 100%	3346	48,6
	95% ≤ Genomas < 99%	634	9,2
Genoma Accesorio	15% ≤ Genomas < 95%	1287	18,7
	0% ≤ Genomas < 15%	1620	23,5
Total genes	0% ≤ Genomas ≤ 100%	6887	100,0

Se muestran el porcentaje de genes que pertenecen al genoma central (48,6%), y genoma accesorio (51,4.2%)

Dentro del conjunto de genes únicos de cada genoma se encuentra 933 proteínas como se puede ver en la Tabla 3. El aislamiento 006 presenta mayor número de proteínas únicas en su genoma (224) donde 191 son proteínas hipotéticas y las restantes 33 están relacionadas con genes de resistencia (Ej. *aacA4*, *cmlA1*), virulencia (Ej. *virB2*, *virB9*), transposones, genes importantes en la adquisición de plásmidos, toxinas, mantenimiento del genoma y proteínas. El siguiente genoma con mayor número de proteínas únicas es el clon EE UU con 93 proteínas hipotéticas y 35 proteínas implicadas en metabolismo, sistemas de secreción, mantenimiento de ADN y una mutación en el sistema toxina-antitoxina.

Se encontraron genes de resistencia a metales pesados como cobre, plata, mercurio y arsénico entre 3 a 6 genomas (Figura 9), mediados por los genes *pcoC*, *pcoE* para cobre, y plata; *silE*, *silP* para plata; *merA*, *merC*, *merP*, *merR*, *merT* para mercurio y *arsABCD* para arsénico.

Figura 9. Representación visual del genoma central y genoma accesorio



Comparación genómica entre 21 aislamientos clínicos STVM comparados con 3 clones epidémicos descritos en la literatura y la cepa de referencia LT2 de *Typhimurium*. En la parte superior se encuentra una escala en kb para identificar la proporción del genoma central (bloque de color azul) y genoma accesorio (pequeños bloques azules), para una mejor correlación en la parte izquierda de la figura se encuentra un árbol filogenético proporcionado por Roary basado en alineación de los genomas centrales. En la parte inferior se encuentra un histograma que representa el genoma central y los genes accserios que LT2 comparte con algunos aislamientos representado por las líneas color morado.

13. Discusión

La plasticidad genómica de *Salmonella* spp. favorece la emergencia de clones endémicos como la variante monofásica de Typhimurium, la cual presenta mayor patogenicidad, transmisibilidad, amplia resistencia a los antibióticos y metales pesados. Se ha diseminado por el mundo con éxito superando al serovar Typhimurium (Sun et al., 2020) adaptándose a nichos ecológicos asociado a la cadena porcícola en particular (Shippy et al., 2018). Es importante recalcar que Colombia el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos en la industria ganadera y porcícola para el control de enteropatógenos como *Salmonella*, tiene un gran impacto en la adquisición de elementos genéticos móviles tanto en muestras de alimentos como clínicas (Arenas & Moreno Melo, 2018), tal impacto en la bacteria tiene una implicación directa en la circulación de diferentes clones epidémicos producto de eventos independientes responsable del proceso de microevolución con una gran cantidad de variaciones genotípicas (Petrovska et al., 2016).

13.1 Análisis Filogenético y plasticidad del genoma

En Colombia existen 2 reportes que han estudiado parte de la epidemiología de STVM, uno basado en análisis genómicos y filogenéticos de *S. Typhimurium* y su variante monofásica, en el cual confirman la circulación de ST34 en el país relacionado con el clon epidémico Europeo y su fenotipo más sensible a antibióticos (Li et al., 2019). Por otro lado, en Cuenca *et al* (2020) se relacionan los fenotipos de motilidad y se hace la primera mención de varios linajes clonales incluidos el Clon Español, Europeo, EE.UU, variante atípica y variante inconsistente, basada en una clasificación preliminar por PCR convencional teniendo en cuenta los patrones de delección del operón *fljAB* (Cuenca-Arias et al., 2020; Soyer et al., 2009). En el presente estudio se empleó la secuenciación de genoma completo-WGS para estudiar las variaciones en los genomas, identificar los SNPs, el perfil MLST junto a delecciones e inserciones para inferir la propagación de clones epidémicos a nivel nacional de una forma más exacta. Como resultado, se identificaron 4 secuenciotipos (Figura 3): el ST19 ancestral fue el predominante (Branchu, Bawn, & Kingsley, 2018), que ha sido relacionado con el clon Español y EE.UU. El ST7478, el cual había sido reportado para Typhimurium pero no se había relacionado con la variante monofásica siendo este, el primer

reporte y el ST34, el cual recientemente mostró un incremento de la diseminación de este secuenciotipo asociado a muestras de sangre reportaron un incremento en sus aislamientos (Li et al., 2019).

Al relacionar los grupos filogenéticos con los genes identificados en este estudio, las regiones de profagos parecen variar de acuerdo con el subgrupo donde se encuentren presentes. En el subgrupo 1 relacionado con el clon EE.UU se encuentra el profago SP_004 cuya presencia se ha descrito en aislamientos de *S. Typhimurium* de fuentes como ganado lechero y productos lácteos en EE. UU (Moreno Switt et al., 2013). Otro profago presente en este subgrupo es el profago GF-2 que es específico de *Edwardsiella Tarda* (Mohammed & Thapa, 2020). El subgrupo 2 evidencia conservación de los profagos Gifsy-1 (profago propio de LT2) y sal3 (propio de *S. enteritidis*) en conjunto con otros fagos como SfV o Sfl, que se caracterizan por su capacidad de portar factores de virulencia (Lyu et al., 2021). El subgrupo 3 conserva 2 profagos propios de LT2 junto a GF-2 y phi20. En la Figura 7 se puede observar el conjunto de bloques de familias de genes de profagos como Fels1 y Gifsy2 conservados en la cepa de referencia LT2.

13.2 Las variantes de STVM albergan diferentes plásmidos, genes de resistencia a antibióticos y elementos genéticos integrativos (ICE)

Los perfiles de resistencia a antibióticos de STVM son muy variables, por lo general en EE. UU (Norte América) y Brasil (Sur América) son pan-susceptibles o resistentes a sólo unos pocos antibióticos, mientras en Europa muestran dos patrones de MDR predominantes conectados con los denominados clones Europeo y Español (García et al., 2011).

Dentro de los aislamientos colombianos analizados el patrón más conservado de resistencia es a Tetraciclina, Cloranfenicol y Ampicilina como se puede observar en la figura 8. Los aislamientos 002, 014 y 015 del subgrupo 2 relacionados filogenéticamente con el clon Europeo presentan resistencia a Ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas, y exhiben tolerancia a metales pesados como Cobre, Plata y Arsénico (Figura 10). La resistencia a Tetraciclina conferida por el gen *Tet(B)* está relacionado en particular con el linaje clonal Europeo (García et al., 2011), y es posible que la adquisición de estos genes de resistencia a

antibióticos se deba a la inserción de un transposón-compuesto de la familia Tn21 en el locus *fljAB* como describe (Clark et al., 2020). Por otro lado, la resistencia a 3 metales pesados podría derivar de la adquisición del elemento conjugativo SGI-4 en el cromosoma de la bacteria, debido a la presión selectiva derivada de la acumulación de estos metales en tracto gastrointestinal durante la colonización del patógeno (Bearson et al., 2020). Esta isla también cuenta con genes implicados en la resistencia al arsénico y la homeostasis del cobre. Aunque no es muy común ciertos alimentos procesados como el pan de trigo, el arroz, la leche y productos lácteos y el agua potable pueden estar contaminados con arsénico, debido a suelos contaminados por la quema de carbón o madera con este metal como conservante o subproducto junto con el cobre proveniente de suelos contaminados y que puede acumularse en productos de aves de corral, bovinos y porcinos (Branchu et al., 2019).

La tolerancia a otros metales pesados como el Mercurio se identificó en 5 aislamientos de grupos filogenéticos diferentes (Figura 9). La resistencia a este metal se ha descrito como determinante del éxito de la variante monofásica que posiblemente es adquirido por un transposón Tn21, ya que este elemento es utilizado de forma indirecta como plaguicida para el cultivo de semillas destinadas a la alimentación de animales de engorde (García et al., 2011).

Interesantemente, el aislamiento 006 cuenta con la Isla Genómica de *Salmonella*-1 (SGI-1) que posee un integrón de clase 1 portador de genes que confieren resistencia a ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, estreptomicina, espectinomicina, sulfonamidas y tetraciclina (Doublet, Boyd, Mulvey, & Cloeckert, 2005; Hall, 2010).

13.3 Adquisición de plásmidos y plásmido de virulencia propio de *S. Typhimurium* se encuentra como plásmido híbrido pSTV.

En STVM se ha descrito que una de las posibles causas de su comportamiento monofásico se deba a la inserción del transposón IS26 en la región promotora de la segunda flagelar (Boland et al., 2015), pero además de estar implicada en alteraciones de esta región genómica juega un papel importante en la en la propagación, agrupamiento y recombinación de genes de resistencia, así como mediar la fusión de plásmidos IncFII, plásmido IncX3, IncHI2 e IncFIB (Wong, Chan, & Chen, 2017). En el presente estudio 14 aislamientos

presentan plásmidos híbridos IncFII-IncFIB que podrían fusionarse con plásmidos no conjugados que codifican resistencia a Tetraciclina y Cloranfenicol, promoviendo la conversión a plásmidos conjugativos transmisibles entre diferentes especies de Enterobacterias como afirma (Liu et al., 2021) en su trabajo más reciente sobre la formación de plásmidos híbridos mediados por IS26. Por otra parte en el linaje clonal Europeo se reporta la ausencia del plásmido pSTV como se observa del subgrupo 2 los aislamientos ST34 relacionados con este clon.

Adicionalmente se encontraron plásmidos de resistencia que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncA/C, IncFIA(HI1), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncQ1, IncI1-I(Alpha) y los plásmidos pequeños en los aislamientos responsables de portar genes de resistencia para quinolonas (Li et al., 2019).

13.3.1 La ausencia de ciertas proteínas flagelares y factores de virulencia sugiere una colonización intestinal no necesaria como proceso de adaptación al huésped dependiendo la forma de diseminación del patógeno.

Dentro de los 21 genomas, encontramos algunos aislamientos con variaciones en proteínas implicadas en adherencia y colonización como genes flagelares, operones fimbriales y factores de virulencia. La ausencia de las proteínas flagelares FliJ, FliL y mutaciones en FliF y el gen regulador *FlhD* en algunos aislamientos podrían afectar la quimiotaxis de estas cepas. FliJ es una proteína citoplasmática implicada en la exportación de sustratos, los mutantes con defectos en FliJ no pueden exportar sustratos del gancho al periplasma (Minamino, Chu, Yamaguchi, & Macnab, 2000), aunque no se ha descrito su ausencia, sí hay estudios como el de Tatsuya et al. (2013) donde se describen mutaciones específicas que afectan su funcionalidad (Ibuki et al., 2013). Por otro lado, la ausencia de FliL conduce a una variedad de defectos de motilidad, que van desde la inhibición moderada a completa de la natación en algunas especies bacterianas como en *Caulobacter*, *Pseudomonas* y *Rhodobacter* o la inhibición de la motilidad en patógenos como *E. coli* y *Salmonella* durante la transición del desarrollo del tallo del flagelo (Partridge, Nieto, & Harshey, 2015). La proteína flagelar FliF está involucrada en la formación del anillo MS del cuerpo basal flagelar de *Salmonella* spp., pieza clave para el ensamble de todo

el complejo flagelar de 26 proteínas, variaciones en esta proteína conlleva a fenotipos no flagelados. Se han descrito como principales mutaciones la pérdida de Ala-174 y Ser-175 en el dominio periplásmico previsto de la proteína FliF (Kihara, Minamino, Yamaguchi, & Macnab, 2001). Sin embargo, en 3 de los aislamientos estudiados se observó un cambio en Ala-354 por Thr que representa un cambio de un aminoácido polar neutro por uno polar sin carga.

FlhD es un regulador transcripcional maestro de varios operones flagelares responsable de la activación de la expresión de genes flagelares de clase 2, incluido *fliA*. Albanna *et al* (2018) describe: “los cambios de aminoácidos más significativos se encuentran dentro de los últimos 8 aminoácidos del extremo C-terminal. Otras sustituciones se encuentran dispersas en cada proteína y no proporcionan un patrón mutacional consistente que proporcione una explicación fenotípica clara” (Albanna *et al.*, 2018). Tal como se observa en el aislamiento 001 (figura 5B), que ha sido denominado variante inconsistente pues conserva los genes de la segunda fase flagelar y aun así se comporta como una variante monofásica, presenta un aparente cambio en el marco de lectura de los últimos 5 aminoácidos que podría estar implicado en este comportamiento “inconsistente” y su fenotipo de motilidad aumentada vista en el estudio anterior (Cuenca-Arias *et al.*, 2020). La ausencia del pSTV que porta el operón fimbrial *pef* se observa en los aislamientos relacionados con el clon Europeo. Así, el carecer de estos genes fimbriales tiene cambios en el proceso de invasión, aunque en estos aislamientos podrían presentarse una variedad de elementos genéticos que los hacen más virulentos.

Los sistemas de secreción juegan un papel crucial en procesos de invasión en especial los sistemas de secreción de tipo III (T3SS) con genes como *sspH2*, *sptP*, *sseABIK*, *ssaL* (Figura 6). Por ejemplo, el gen *sseI* se inactiva en ST313 debido a la inserción de un elemento transponible y da como resultado una hiperdifusión del patógeno a sitios sistémicos del huésped. Es posible que la ausencia de este gen en el aislamiento 013 esté relacionado con un elemento transponible dada la amplia adquisición de elementos genéticos móviles en la variante monofásica. Un estudio reporta que el gen *sseK* inhibe la señalización de NF- κ B y también suprime la muerte de la célula huésped, este gen a su vez interactúa con *Rab* en etapas posteriores de la infección por *Salmonella* (Gan *et al.*, 2020). La ausencia de dichos

genes sugiere una inactivación del T3SS dependiendo su forma de diseminación y a que la colonización intestinal no sea necesaria, resultando en una propagación facilitada de la bacteria (Günster, Matthews, Holden, & Thurston, 2017).

14. Conclusiones

La determinación de la ganancia o pérdida de genes del genoma completo en los aislamientos de STVM colombianos permitió una reclasificación de los linajes clonales circulantes en el país y estudiar su alta plasticidad genómica mediada por la adquisición de elementos genéticos móviles y conjugativos.

Los aislamientos analizados por secuenciación muestran que en Colombia circulan diferentes linajes de variante monofásica, lo que sugiere múltiples eventos de introducción de este serovar desde su identificación en 2015. Los análisis confirmaron que algunos aislamientos están relacionados con el clon Europeo y EE.UU, tanto por filogenia como por las características compartidas. Se identificó la presencia de profagos propios de los clones Europeo (sal3) y EE.UU (sp_004) así como agrupación de profagos específicos en los 3 subgrupos filogenéticos. Sin embargo, la adquisición de plásmidos resultó ser independiente de los linajes clones. Los aislamientos clasificados como clon Europeo (subgrupo 2) presentan los genes de tolerancia a metales pesados posiblemente por la integración de SGI-4. En su mayoría este subgrupo 2 carece de algunos genes fimbriales y flagelares involucrados en procesos de adhesión, invasión y colonización como posible resultado de adaptación específica al huésped. Estos carecen de genes de resistencia a mercurio, a diferencia de observado en los aislamientos 006, 007, 008, 009 y 018.

Se observó la pérdida de profagos propios de *S. Typhimurium* LT2 y una alta diversidad de plásmidos. También genes que confieren resistencia de 3 a 6 familias de antibióticos principalmente a Tetraciclina, Cloranfenicol y Sulfonamidas; así como resistencia a lincosamida en 1 aislamiento.

Se destacaron los genotipos de las cepas 006, 007 y 009 al ser aislados de materia fecal y orina respectivamente, y poseer una gran cantidad de plásmidos pequeños y mayor cantidad de genes de resistencia a antibióticos.

Los resultados sugieren un proceso de adaptación de la nueva serovariedad de *S. Typhimurium* independiente del linaje clonal, fuente u origen geográfico.

15. Recomendaciones

Sería importante estudiar los aislamientos de STVM con modelos *in vitro* para caracterizar su perfil de virulencia tanto en macrófagos como organismos modelo de ratones.

16. Bibliografía

- Achard, M. E. S., Stafford, S. L., Bokil, N. J., Chartres, J., Bernhardt, P. V., Schembri, M. A., ... McEwan, A. G. (2012). Copper redistribution in murine macrophages in response to Salmonella infection. *The Biochemical Journal*, 444(1), 51–57. doi:10.1042/BJ20112180
- Albanna, A., Sim, M., Hoskisson, P. A., Gillespie, C., Rao, C. V., & Aldridge, P. D. (2018). Driving the expression of the Salmonella enterica sv Typhimurium flagellum using flhDC from Escherichia coli results in key regulatory and cellular differences. *Scientific Reports*, 8(1), 16705. doi:10.1038/s41598-018-35005-2
- Arenas, N. E., & Moreno Melo, V. (2018). Producción pecuaria y emergencia de antibiótico resistencia en Colombia: Revisión sistemática. *Infectio*, 22(2), 110. doi:10.22354/in.v22i2.717
- Arnott, A., Wang, Q., Bachmann, N., Sadsad, R., Biswas, C., Sotomayor, C., ... Sintchenko, V. (2018). Multidrug-Resistant Salmonella enterica 4,[5],12:i:- Sequence Type 34, New South Wales, Australia, 2016-2017. *Emerging Infectious Diseases*, 24(4), 751–753. doi:10.3201/eid2404.171619
- Ashton, P. M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W. P. M., Lane, C. R., Larkin, L., ... Dallman, T. J. (2017). Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive Salmonella Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Medicine*, 9(1), 92. doi:10.1186/s13073-017-0480-7
- Barco, L., Longo, A., Lettini, A. A., Cortini, E., Saccardin, C., Minorello, C., ... Ricci, A. (2014). Molecular characterization of “inconsistent” variants of Salmonella Typhimurium isolated in Italy. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 497–499. doi:10.1089/fpd.2013.1714

- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (2016). [Salmonella enterica: a review or the trilogy agent, host and environment and its importance in Chile]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 33(5), 547–557. doi:10.4067/S0716-10182016000500010
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., & Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by Salmonella typhimurium. *Infection and Immunity*, 64(5), 1862–1865. doi:10.1128/iai.64.5.1862-1865.1996
- Bearson, B. L., Trachsel, J. M., Shippy, D. C., Sivasankaran, S. K., Kerr, B. J., Loving, C. L., ... Bearson, S. M. D. (2020). The Role of Salmonella Genomic Island 4 in Metal Tolerance of Salmonella enterica Serovar I 4,[5],12:i:- Pork Outbreak Isolate USDA15WA-1. *Genes*, 11(11). doi:10.3390/genes11111291
- Boland, C., Bertrand, S., Mattheus, W., Dierick, K., Jasson, V., Rosseel, T., ... Wattiau, P. (2015). Extensive genetic variability linked to IS26 insertions in the fljB promoter region of atypical monophasic variants of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(9), 3169–3175. doi:10.1128/AEM.00270-15
- Boland, C., Van Hesseche, M., Mahillon, J., & Wattiau, P. (2018). A liquid bead array for the identification and characterization of fljB-positive and fljB-negative monophasic variants of Salmonella Typhimurium. *Food microbiology*, 71, 17–24. doi:10.1016/j.fm.2017.04.006
- Bonifield, H. R., & Hughes, K. T. (2003). Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *Journal of Bacteriology*, 185(12), 3567–3574. doi:10.1128/JB.185.12.3567-3574.2003
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. doi:10.1093/jac/dkaa345
- Branchu, P., Bawn, M., & Kingsley, R. A. (2018). Genome Variation and Molecular Epidemiology of Salmonella enterica Serovar Typhimurium Pathovariants. *Infection and Immunity*, 86(8). doi:10.1128/IAI.00079-18
- Branchu, P., Charity, O. J., Bawn, M., Thilliez, G., Dallman, T. J., Petrovska, L., & Kingsley, R. A. (2019). SGI-4 in Monophasic Salmonella Typhimurium ST34 Is a Novel ICE That Enhances Resistance to Copper. *Frontiers in microbiology*, 10, 1118. doi:10.3389/fmicb.2019.01118

- Caffer, M. I. (2009). Identificación y Serotipificación de *Salmonella* spp .
- Carlos Adelantado, E. Leonardo Arosemena, M^a Angeles Calvo, Luis Manteca, R. E. D. A. (2008). La SALMONELLA, de ACTUALIDAD desde SIEMPRE.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2018). *National Enteric Disease Surveillance : Salmonella Annual Report 2016* (pp. 1–87). Atlanta, USA: CDC. Retrieved from <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella-surveillance.html>
- Clark, C. G., Landgraff, C., Robertson, J., Pollari, F., Parker, S., Nadon, C., ... Nash, J. (2020). Distribution of heavy metal resistance elements in Canadian *Salmonella* 4,[5],12:i:- populations and association with the monophasic genotypes and phenotype. *Plos One*, *15*(7), e0236436. doi:10.1371/journal.pone.0236436
- Crayford, G., Coombes, J. L., Humphrey, T. J., & Wigley, P. (2014). Monophasic expression of *FliC* by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells. *Microbiology*, *160*(Pt 11), 2507–2516. doi:10.1099/mic.0.081349-0
- Cuenca-Arias, P., Cobos-Leon, Y. T., Zabaleta Espinosa, G. A., Montaña Valencia, L. A., Villarreal Ascencio, J. M., & Wiesner Reyes, M. (2017). Identificación de genes *tetA* y *tetB* en aislamientos clínicos Colombianos de *Salmonella* spp. Presented at the XV Encuentro Científico del Instituto Nacional de Salud, Revista Biomedica. Vol. 37: Suplemento 3, XV Encuentro Científico, noviembre.
- Cuenca-Arias, P., Montaña, L. A., Villarreal, J. M., & Wiesner, M. (2020). Caracterización molecular y fenotípica de aislamientos clínicos de *Salmonella* Typhimurium variante monofásica 1,4, [5], 12: i - recuperados en Colombia. *Biomédica*, *40*.
- Di Cesare, A., Losasso, C., Barco, L., Eckert, E. M., Conficoni, D., Sarasini, G., ... Ricci, A. (2016). Diverse distribution of Toxin-Antitoxin II systems in *Salmonella* enterica serovars. *Scientific Reports*, *6*, 28759. doi:10.1038/srep28759
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M. R., & Cloeckert, A. (2005). The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular Microbiology*, *55*(6), 1911–1924. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x
- ECDC. (2014). European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 food and waterborne diseases and zoonoses. *SURVEILLANCE REPORT*.

- Echeita, M. A., Herrera, S., & Usera, M. A. (2001). Atypical, fljB-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar Typhimurium. *Journal of Clinical Microbiology*, *39*(8), 2981–2983. doi:10.1128/JCM.39.8.2981-2983.2001
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. *EFSA Journal*, *8*(10), 1826. doi:10.2903/j.efsa.2010.1826
- Elnekave, E., Hong, S., Mather, A. E., Boxrud, D., Taylor, A. J., Lappi, V., ... Alvarez, J. (2018). *Salmonella enterica* Serotype 4,[5],12:i:- in Swine in the United States Midwest: An Emerging Multidrug-Resistant Clade. *Clinical Infectious Diseases*, *66*(6), 877–885. doi:10.1093/cid/cix909
- Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(2), 308–341. doi:10.1128/CMR.00066-12
- Gan, J., Scott, N. E., Newson, J. P. M., Wibawa, R. R., Wong Fok Lung, T., Pollock, G. L., ... Giogha, C. (2020). The salmonella effector ssek3 targets small rab gtpases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *10*, 419. doi:10.3389/fcimb.2020.00419
- Garaizar, J., Porwollik, S., Echeita, A., Rementeria, A., Herrera, S., Wong, R. M.-Y., ... McClelland, M. (2002). DNA microarray-based typing of an atypical monophasic *Salmonella enterica* serovar. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(6), 2074–2078. doi:10.1128/jcm.40.6.2074-2078.2002
- García, P., Guerra, B., Bances, M., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2011). IncA/C plasmids mediate antimicrobial resistance linked to virulence genes in the Spanish clone of the emerging *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:-. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(3), 543–549. doi:10.1093/jac/dkq481
- García, P., Hopkins, K. L., García, V., Beutlich, J., Mendoza, M. C., Threlfall, J., ... Med-Vet-Net WP21 Project Group. (2014). Diversity of plasmids encoding virulence and resistance functions in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 4,[5],12:i:- strains circulating in Europe. *Plos One*, *9*(2), e89635. doi:10.1371/journal.pone.0089635
- García, P., Malorny, B., Hauser, E., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2013). Genetic types, gene repertoire, and evolution of isolates of the *Salmonella enterica* serovar 4,5,12:i:- Spanish clone assigned to different phage types. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(3), 973–978. doi:10.1128/JCM.02777-12

- García, P., Malorny, B., Rodicio, M. R., Stephan, R., Hächler, H., Guerra, B., & Lucarelli, C. (2016). Horizontal Acquisition of a Multidrug-Resistance Module (R-type ASSuT) Is Responsible for the Monophasic Phenotype in a Widespread Clone of Salmonella Serovar 4,[5],12:i:. *Frontiers in microbiology*, 7, 680. doi:10.3389/fmicb.2016.00680
- Gart, E. V., Suchodolski, J. S., Welsh, T. H., Alaniz, R. C., Randel, R. D., & Lawhon, S. D. (2016). Salmonella typhimurium and multidirectional communication in the gut. *Frontiers in microbiology*, 7, 1827. doi:10.3389/fmicb.2016.01827
- Grimont, P., & Weill, F.-X. (2008). Antigenic formulae of the ' ' Salmonella serovars. *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, 1–167.
- Guerra, B., Soto, S. M., Argüelles, J. M., & Mendoza, M. C. (2001). Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integron in the emergent Salmonella enterica serotype [4,5,12:i:-]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1305–1308. doi:10.1128/AAC.45.4.1305-1308.2001
- Günster, R. A., Matthews, S. A., Holden, D. W., & Thurston, T. L. M. (2017). SseK1 and SseK3 Type III Secretion System Effectors Inhibit NF-κB Signaling and Necroptotic Cell Death in Salmonella-Infected Macrophages. *Infection and Immunity*, 85(3). doi:10.1128/IAI.00010-17
- Hall, R. M. (2010). Salmonella genomic islands and antibiotic resistance in Salmonella enterica. *Future Microbiology*, 5(10), 1525–1538. doi:10.2217/fmb.10.122
- Hauser, E., Tietze, E., Helmuth, R., Junker, E., Blank, K., Prager, R., ... Malorny, B. (2010). Pork contaminated with Salmonella enterica serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4601–4610. doi:10.1128/AEM.02991-09
- Hopkins, K. L., Kirchner, M., Guerra, B., Granier, S. A., Lucarelli, C., Porrero, M. C., ... Mevius, D. J. (2010). Multiresistant Salmonella enterica serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveillance*, 15(22), 19580.
- Ibuki, T., Uchida, Y., Hironaka, Y., Namba, K., Imada, K., & Minamino, T. (2013). Interaction between FliJ and FlhA, components of the bacterial flagellar type III export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 466–473. doi:10.1128/JB.01711-12
- Ido, N., Kudo, T., Sasaki, K., Motokawa, M., Iwabuchi, K., Matsudate, H., ... Akiba, M. (2011). Molecular and phenotypic characteristics of Salmonella enterica serovar

- 4,5,12:i:- isolated from cattle and humans in Iwate Prefecture, Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73(2), 241–244.
- Ipinza, F., Collao, B., Monsalva, D., Bustamante, V. H., Luraschi, R., Alegría-Arcos, M., ... Saavedra, C. P. (2014). Participation of the Salmonella OmpD porin in the infection of RAW264.7 macrophages and BALB/c mice. *Plos One*, 9(10), e111062. doi:10.1371/journal.pone.0111062
- Kihara, M., Minamino, T., Yamaguchi, S., & Macnab, R. M. (2001). Intergenic suppression between the flagellar MS ring protein FliF of Salmonella and FlhA, a membrane component of its export apparatus. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1655–1662. doi:10.1128/JB.183.5.1655-1662.2001
- Ladomersky, E., Khan, A., Shanbhag, V., Cavet, J. S., Chan, J., Weisman, G. A., & Petris, M. J. (2017). Host and Pathogen Copper-Transporting P-Type ATPases Function Antagonistically during Salmonella Infection. *Infection and Immunity*, 85(9). doi:10.1128/IAI.00351-17
- Lan, T. T. Q., Gaucher, M.-L., Nhan, N. T. M., Letellier, A., & Quessy, S. (2018). Distribution of Virulence Genes among Salmonella Serotypes Isolated from Pigs in Southern Vietnam. *Journal of Food Protection*, 81(9), 1459–1466. doi:10.4315/0362-028X.JFP-17-408
- Ledeboer, N. A., Frye, J. G., McClelland, M., & Jones, B. D. (2006). Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue culture cells and chicken intestinal epithelium. *Infection and Immunity*, 74(6), 3156–3169. doi:10.1128/IAI.01428-05
- Li, Y., Pulford, C. V., Díaz, P., Perez-Sepulveda, B. M., Duarte, C., Predeus, A. V., ... Hinton, J. C. D. (2019). Genomic and phylogenetic analysis of *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variants responsible for invasive endemic infections in Colombia. *BioRxiv*. doi:10.1101/588608
- Liu, Y.-Y., He, D.-D., Zhang, M.-K., Pan, Y.-S., Wu, H., Yuan, L., ... Hu, G.-Z. (2021). The Formation of Two Hybrid Plasmids Mediated by IS26 and Tn6952 in Salmonella enterica Serotype Enteritidis. *Frontiers in microbiology*, 12, 676574. doi:10.3389/fmicb.2021.676574
- Lynch, H., Argüello, H., Walia, K., Lawlor, P. G., Duffy, G., Gardiner, G. E., & Leonard, F. C. (2017). Evaluation of an alternative experimental infection method, which closely mimics the natural route of transmission of monophasic salmonella typhimurium in pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(1), 23–28. doi:10.1089/fpd.2016.2193

- Lyu, N., Feng, Y., Pan, Y., Huang, H., Liu, Y., Xue, C., ... Hu, Y. (2021). Genomic Characterization of *Salmonella enterica* Isolates From Retail Meat in Beijing, China. *Frontiers in microbiology*, *12*, 636332. doi:10.3389/fmicb.2021.636332
- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., ... International Collaboration on Enteric Disease "Burden of Illness" Studies. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(6), 882–889. doi:10.1086/650733
- Mastrorilli, E., Pietrucci, D., Barco, L., Ammendola, S., Petrin, S., Longo, A., ... Losasso, C. (2018). A comparative genomic analysis provides novel insights into the ecological success of the monophasic salmonella serovar 4,[5],12:i:. *Frontiers in microbiology*, *9*, 715. doi:10.3389/fmicb.2018.00715
- McDermott, P. F., Tyson, G. H., Kabera, C., Chen, Y., Li, C., Folster, J. P., ... Zhao, S. (2016). Whole-Genome Sequencing for Detecting Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(9), 5515–5520. doi:10.1128/AAC.01030-16
- Minamino, T., Chu, R., Yamaguchi, S., & Macnab, R. M. (2000). Role of FliJ in flagellar protein export in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, *182*(15), 4207–4215. doi:10.1128/JB.182.15.4207-4215.2000
- Mohammed, M., & Thapa, S. (2020). Evaluation of WGS-subtyping methods for epidemiological surveillance of foodborne salmonellosis. *One Health Outlook*, *2*, 13. doi:10.1186/s42522-020-00016-5
- Montaño V, L. A., Sossa U, D. P., & Correa C, F. P. (2018). *Vigilancia por Laboratorio de Salmonella spp. Dirección en Redes de salud Pública. Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia - Grupo de Microbiología*. Bogotá, Colombia: Intituto Ncional de Salud.
- Moreno Switt, A. I., Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Vongkamjan, K., Altier, C., & Wiedmann, M. (2013). Genomic characterization provides new insight into *Salmonella* phage diversity. *BMC Genomics*, *14*, 481. doi:10.1186/1471-2164-14-481
- Mourão, J., Novais, C., Machado, J., Peixe, L., & Antunes, P. (2015). Metal tolerance in emerging clinically relevant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *45*(6), 610–616. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.01.013

- Mulvey, M. R., Finley, R., Allen, V., Ang, L., Bekal, S., El Bailey, S., ... Gilmour, M. (2013). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: results from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(9), 1982–1986. doi:10.1093/jac/dkt149
- Naberhaus, S. A., Krull, A. C., Arruda, B. L., Arruda, P., Sahin, O., Schwartz, K. J., ... Kreuder, A. J. (2019). Pathogenicity and Competitive Fitness of *Salmonella enterica* Serovar 4,[5],12:i:- Compared to *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Derby in Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 502. doi:10.3389/fvets.2019.00502
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., ... Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. doi:10.1093/bioinformatics/btv421
- Partridge, J. D., Nieto, V., & Harshey, R. M. (2015). A new player at the flagellar motor: FliL controls both motor output and bias. *mBio*, 6(2), e02367. doi:10.1128/mBio.02367-14
- Petrin, S., Longo, A., Barco, L., Cortini, E., Peruzzo, A., Antonelli, P., ... Losasso, C. (2019). Different Resolution Power of Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing in the Characterization of *S.* 1,4,[5],12:i:- Isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(8), 558–561. doi:10.1089/fpd.2018.2563
- Petrovska, L., Mather, A. E., AbuOun, M., Branchu, P., Harris, S. R., Connor, T., ... Kingsley, R. A. (2016). Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerging Infectious Diseases*, 22(4), 617–624. doi:10.3201/eid2204.150531
- 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), 801. doi:10.1186/s12864-018-5137-4
- Seixas, R., Machado, J., Bernardo, F., Vilela, C., & Oliveira, M. (2014). Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar 1,4,[5],12:i:- Portuguese isolates: a phenotypic, genotypic, and socio-geographic analysis. *Current Microbiology*, 68(5), 670–677. doi:10.1007/s00284-014-0523-x

- Seixas, R., Santos, T. R., Machado, J., Tavares, L., Bernardo, F., Semedo-Lemsaddek, T., & Oliveira, M. (2016). Phenotypic and Molecular Characterization of Salmonella 1,4,[5],12:i:- R-Type ASSuT Isolates from Humans, Animals, and Environment in Portugal, 2006-2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, *13*(11), 633–641. doi:10.1089/fpd.2016.2156
- Shippy, D. C., Bearson, B. L., Holman, D. B., Brunelle, B. W., Allen, H. K., & Bearson, S. M. D. (2018). Porcine Response to a Multidrug-Resistant Salmonella enterica serovar I 4,[5],12:i:- Outbreak Isolate. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(5), 253–261. doi:10.1089/fpd.2017.2378
- Soyer, Y., Moreno Switt, A., Davis, M. A., Maurer, J., McDonough, P. L., Schoonmaker-Bopp, D. J., ... Wiedmann, M. (2009). Salmonella enterica serotype 4,5,12:i:-, an emerging Salmonella serotype that represents multiple distinct clones. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(11), 3546–3556. doi:10.1128/JCM.00546-09
- Sun, H., Wan, Y., Du, P., & Bai, L. (2020). The epidemiology of monophasic salmonella typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, *17*(2), 87–97. doi:10.1089/fpd.2019.2676
- Tomiyama, M. P. O., Werle, C. H., Milanez, G. P., Nóbrega, D. B., Pereira, J. P., Calarga, A. P., ... Brocchi, M. (2015). Salmonella enterica Typhimurium fljBA operon stability: implications regarding the origin of Salmonella enterica I 4,[5],12:i:-. *Genetics and Molecular Research*, *14*(4), 19057–19065. doi:10.4238/2015.December.29.13
- view, C. (2013). Timeline for Reporting Cases of Salmonella Infection. *Centers for Disease Control and Prevention*, 3–5.
- Weaver, T., Valcanis, M., Mercoulia, K., Sait, M., Tuke, J., Kiermeier, A., ... Billman-Jacobe, H. (2017). Longitudinal study of Salmonella 1,4,[5],12:i:- shedding in five Australian pig herds. *Preventive Veterinary Medicine*, *136*, 19–28. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.11.010
- Wong, M. H.-Y., Chan, E. W.-C., & Chen, S. (2017). IS26-mediated formation of a virulence and resistance plasmid in Salmonella Enteritidis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(10), 2750–2754. doi:10.1093/jac/dkx238
- World health Organization. (2018, February). Salmonella (non-typhoidal). Retrieved October 18, 2021, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

- Yamamoto, S., & Kutsukake, K. (2006). FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *188*(3), 958–967. doi:10.1128/JB.188.3.958-967.2006
- Zamperini, K., Soni, V., Waltman, D., Sanchez, S., Theriault, E. C., Bray, J., & Maurer, J. J. (2007). Molecular characterization reveals *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- from poultry is a variant Typhimurium serovar. *Avian Diseases*, *51*(4), 958–964. doi:10.1637/7944-021507-REGR.1

Figura Complementaria 1. Matriz basada en longitud y distancias de ramas de la filogenia inferida por SNP

	001	018	022	008	009	016	021	EEUU	002	Europeo	014	015	Espanol	023	006	013	017	020	007	010	003	019	011	012	LT2
001	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.39	0.38	0.37	0.36	0.36	0.37	0.43	0.31	0.32	0.32	0.37	0.34	0.34	0.32	0.31	0.36	0.31	0.33	0.27	
018	0.27	0.01	0.02	0.01	0.01	0.35	0.34	0.33	0.31	0.32	0.32	0.32	0.39	0.27	0.27	0.27	0.32	0.30	0.29	0.27	0.27	0.32	0.27	0.28	0.23
022	0.27	0.01	0.01	0.01	0.00	0.35	0.34	0.33	0.31	0.32	0.32	0.32	0.39	0.27	0.27	0.27	0.32	0.30	0.29	0.27	0.27	0.32	0.27	0.28	0.23
008	0.28	0.02	0.01	0.02	0.01	0.36	0.35	0.34	0.33	0.33	0.33	0.33	0.40	0.28	0.28	0.28	0.33	0.31	0.30	0.28	0.28	0.33	0.28	0.29	0.24
009	0.27	0.01	0.01	0.02	0.00	0.35	0.34	0.33	0.32	0.32	0.33	0.33	0.39	0.27	0.27	0.28	0.33	0.30	0.30	0.27	0.27	0.32	0.27	0.29	0.23
016	0.27	0.01	0.00	0.01	0.00	0.35	0.34	0.33	0.31	0.32	0.32	0.32	0.39	0.27	0.27	0.27	0.32	0.30	0.29	0.27	0.27	0.32	0.27	0.28	0.23
021	0.39	0.35	0.35	0.36	0.35	0.35	0.04	0.29	0.27	0.28	0.28	0.28	0.35	0.27	0.28	0.28	0.33	0.30	0.30	0.28	0.27	0.32	0.27	0.29	0.23
EEUU	0.38	0.34	0.34	0.35	0.34	0.34	0.04	0.28	0.27	0.27	0.28	0.34	0.27	0.27	0.27	0.32	0.30	0.29	0.27	0.27	0.27	0.32	0.27	0.28	0.23
002	0.37	0.33	0.33	0.34	0.33	0.33	0.29	0.28	0.02	0.02	0.03	0.33	0.25	0.26	0.26	0.31	0.28	0.28	0.26	0.25	0.30	0.25	0.27	0.21	
Europeo	0.36	0.31	0.31	0.33	0.32	0.31	0.27	0.27	0.02	0.01	0.02	0.32	0.24	0.25	0.25	0.30	0.27	0.27	0.24	0.24	0.29	0.24	0.26	0.20	
014	0.36	0.32	0.32	0.33	0.32	0.32	0.28	0.27	0.02	0.01	0.01	0.32	0.24	0.25	0.25	0.30	0.27	0.27	0.25	0.24	0.29	0.24	0.26	0.20	
015	0.37	0.32	0.32	0.33	0.33	0.32	0.28	0.28	0.03	0.02	0.01	0.32	0.25	0.26	0.26	0.31	0.28	0.28	0.25	0.25	0.30	0.25	0.27	0.21	
Espanol	0.43	0.39	0.39	0.40	0.39	0.39	0.35	0.34	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.37	0.35	0.34	0.32	0.32	0.37	0.31	0.33	0.27
023	0.31	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.27	0.27	0.25	0.24	0.24	0.25	0.32	0.02	0.02	0.07	0.04	0.04	0.02	0.01	0.06	0.01	0.03	0.08	
006	0.32	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.28	0.27	0.26	0.25	0.25	0.26	0.32	0.02	0.02	0.07	0.05	0.04	0.02	0.02	0.07	0.02	0.03	0.08	
013	0.32	0.27	0.27	0.28	0.28	0.27	0.28	0.27	0.26	0.25	0.25	0.26	0.32	0.02	0.02	0.07	0.05	0.04	0.02	0.02	0.07	0.02	0.03	0.08	
017	0.37	0.32	0.32	0.33	0.33	0.32	0.33	0.32	0.31	0.30	0.30	0.31	0.37	0.07	0.07	0.07	0.10	0.10	0.07	0.07	0.12	0.07	0.09	0.13	
020	0.34	0.30	0.30	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30	0.28	0.27	0.27	0.28	0.35	0.04	0.05	0.05	0.10	0.06	0.04	0.04	0.09	0.04	0.05	0.11	
007	0.34	0.29	0.29	0.30	0.30	0.29	0.30	0.29	0.28	0.27	0.27	0.28	0.34	0.04	0.04	0.04	0.10	0.06	0.03	0.04	0.08	0.03	0.05	0.10	
010	0.32	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.28	0.27	0.26	0.24	0.25	0.25	0.32	0.02	0.02	0.02	0.07	0.04	0.03	0.01	0.06	0.01	0.03	0.08	
003	0.31	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.27	0.27	0.25	0.24	0.24	0.25	0.32	0.01	0.02	0.02	0.07	0.04	0.04	0.01	0.05	0.01	0.03	0.08	
019	0.36	0.32	0.32	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.30	0.29	0.29	0.30	0.37	0.06	0.07	0.07	0.12	0.09	0.08	0.06	0.05	0.06	0.07	0.13	
011	0.31	0.27	0.27	0.28	0.27	0.27	0.27	0.27	0.25	0.24	0.24	0.25	0.31	0.01	0.02	0.02	0.07	0.04	0.03	0.01	0.01	0.06	0.02	0.07	
012	0.33	0.28	0.28	0.29	0.29	0.28	0.29	0.28	0.27	0.26	0.26	0.27	0.33	0.03	0.03	0.03	0.09	0.05	0.05	0.03	0.03	0.07	0.02	0.09	
LT2	0.27	0.23	0.23	0.24	0.23	0.23	0.23	0.23	0.21	0.20	0.20	0.21	0.27	0.08	0.08	0.08	0.13	0.11	0.10	0.08	0.08	0.13	0.07	0.09	

