



Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas
PEDECIBA
Área Biología, Sub-Área Microbiología

Evolución del resistoma de *Salmonella enterica* en Uruguay



MSc. Nicolás Cordeiro

Orientador:

Dr. Rafael Vignoli

Co-Orientador:

Dra. Teresa Camou

Tribunal:

Dra. Fernanda Azpiroz

Dr. Gustavo Varela

Dr. José Di Conza

UA de Bacteriología y Virología

Instituto de Higiene,

Facultad de Medicina

Montevideo, Uruguay

1. ÍNDICE

2. Abreviaturas	4
3. Resumen	6
4. Introducción	8
4.1. <i>Salmonella</i> spp.	8
4.2. Determinantes de Virulencia en <i>Salmonella enterica</i>	9
4.2.1. Islas de Patogenicidad	11
4.2.2. Toxinas Codificadas por <i>S. enterica</i>	12
4.2.3. Plásmidos de Virulencia	14
4.3. Tratamiento de las Infecciones por <i>Salmonella</i> spp.	16
4.3.1. Resistencia Antibiótica en <i>Salmonella enterica</i> en el Uruguay	17
4.4. Transferencia Horizontal de la Resistencia Antimicrobiana	19
4.4.1. Integrones	20
4.4.2. Elementos Transponibles	23
4.4.3. Plásmidos	26
4.4.3.1 Plásmidos Conjugativos	28
4.4.3.2. Plásmidos Movilizables	29
4.4.3.3. Plásmidos “No Movilizables”	29
4.4.4. Elementos Conjugativos Integrativos	30
4.5. Regulación de la Transferencia Horizontal de Genes	33
4.5.1. Sistemas de Restricción-Modificación	33
4.5.2. Sistemas Toxina-Antitoxina, o de Adicción	35
4.5.3. Silenciamiento Génico Mediante H-NS	37
4.5.4. Sistemas CRISPR/Cas	39
5. Hipótesis	43
5.1. Objetivos	43
5.1.1. Objetivo General	43
5.1.2. Objetivos Específicos	43
6. Materiales y Métodos	45
6.1. Cepas	45
6.2. Procesamiento de las Muestras y Conservación	45
6.3. Estudios de Susceptibilidad Antibiótica	46

6.3.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima a Fosfomicina	46
6.3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima a Colistina	47
6.4.1. Extracción de ADN para Ensayos de PCR	47
6.4.2. Extracción de ADN para Secuenciación Genómica (WGS)	48
6.5. Amplificación de Genes de Resistencia	48
6.6. Secuenciación Genómica	49
6.7. Ensamblado Genómico <i>de novo</i>	49
6.8. Estudios Bioinformáticos	50
6.8.1. Detección de Genes de Resistencia a Antibióticos	50
6.8.2. Búsqueda de Genes de Virulencia y Grupos de Incompatibilidad	51
6.8.3. Generación de <i>Heatmaps</i>	51
6.8.4. Predicción de Serotipos de <i>Salmonella</i>	51
6.8.5. Estudios de Evolución Neutra	52
6.8.6. Predicción y Extracción de Secuencias Plasmídicas	52
6.8.7. Análisis Comparativo de Plásmidos de Tipo Incl	53
6.8.8. Caracterización de los Aislamientos Secuenciados en Nuestra Unidad	54
6.8.9. Predicción de Mecanismos de Defensa Bacterianos	54
6.9. Análisis Estadísticos	54
7. Resultados y Discusión de Aspectos Específicos	56
7.1. Muestras Estudiadas	56
7.2. Detección de Genes de Virulencia	57
7.3. Sistemas de Defensa Bacterianos	60
7.4. Genes de Resistencia Antibiótica	66
7.4.1. Descripción	66
7.4.2. Genes Codificantes de β -lactamasas	70
7.4.2.1. β -lactamasas de Espectro Ampliado	70
7.4.2.2. β -lactamasas de Espectro Extendido	73
7.4.2.3. β -lactamasas de Clase B	79
7.4.2.4. β -lactamasas de Clase C	80
7.4.2.5. β -lactamasas de Clase D	82
7.4.3. Resistencia Transferible a Quinolonas	86
7.4.3.1. Genes de Enmascaramiento del Sitio Blanco	86

7.4.3.2. Genes de Enzimas Modificantes de Quinolonas	89
7.4.3.3. Genes de Extrusión Activa	89
7.4.4. Genes de Resistencia a Aminoglucósidos	90
7.4.4.1. Genes Codificantes de Aminoglucósido O-fosfotransferasas	91
7.4.4.2. Genes Codificantes de Aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas	94
7.4.4.3. Genes Codificantes de Aminoglucósido N-acetiltransferasas	94
7.4.5. Genes de Resistencia a Fosfomicina	98
7.4.6. Genes de Resistencia a Tetraciclinas	101
7.4.7. Genes de Resistencia a Inhibidores de la Síntesis del Folato	104
7.4.8. Genes de Resistencia a Macrólidos	105
7.4.9. Genes de Resistencia a Otras Familias de Antibióticos	107
7.4.10. Perfiles de Resistencia y Correlación entre Genotipo y Fenotipo de RAM	110
7.4.11. Ensayos de Evolución Neutra	115
7.5. Estudio del Plasmidoma	116
7.5.1. Descripción	116
7.5.2. Orígenes de Replicación	118
7.5.3. Análisis de los Plásmidos de tipo IncI1	120
7.6. Plásmidos de Multirresistencia	128
7.6.1. Plásmido pUY094_N	128
7.6.2. Plásmido pUY094_I	131
7.6.3. Plásmido pUY192_H	134
7.6.4. Plásmido pUY193_C	136
8. Discusión y Conclusiones	142
8.1. Viruloma de <i>S. enterica</i>	143
8.2. Sistemas de Defensa en <i>S. enterica</i>	144
8.3. Plasmidoma de <i>S. enterica</i>	149
8.4. Resistoma de <i>S. enterica</i>	165
8.5. Conclusiones	175
9. Perspectivas	177
10. Referencias	178
Anexo	206

2. ABREVIATURAS

ADNbc	ADN bicatenario
ADNmc	ADN monocatenario
AMC	Amoxicilina / Ácido clavulánico
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Acid Tolerance Response
bARTTs	Bacterial ADP-Ribosylating Toxins
BLEA	β -lactamasa de Espectro Ampliado
BLEE	β -lactamasa de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRISPR	Clustered, Regularly Interspaced, Short Palindromic Repeats
CRO	Ceftriaxona
CTG	Cefalosporinas de Tercera Generación
EDTA	Ácido Etilendiamina Tetraacético
EGM	Elementos Genéticos Móviles
ET	Elementos Transponibles
ICE	Integrative and Conjugative Element
IMI	Imipenem
IS	Secuencias de Inserción
LB	Luria Bertani
MEM	Meropenem
MPF	Mating Pair Formation
MTasa	Metiltransferasa
ncRNA	non-coding RiboNucleic Acid
ON	Overnight
ORF	Open Reading Frame
PAT4	Proteína de Acoplamiento de Tipo IV
PBRT	PCR-Based Replicon Typing
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis

pMLST	plasmid Multi Locus Sequence Typing
RAM	Resistencia Antibiótica
REasas	Endonucleasa de Restricción
RIF	Rifampicina
RIF	Rifampicina
R-M	Restricción-Modificación
rpm	Revoluciones por minuto
SCV	<i>Salmonella</i> -Containing Vacuole
SGI1	<i>Salmonella</i> Genomic Island 1
SNT	<i>Salmonella</i> No Tifoidea
SPI	Salmonella Pathogenicity Island
SST4	Sistemas de Secreción de Tipo IV
T3SS-1	SPI-1 Type III Secretion System
T3SS-2	SPI-2 Type III Secretion System
T6SS	Type VI Secretion System
TA	Toxina-Antitoxina
TCS	Tetra Correlation Search
TE	Tris-EDTA
THG	Transferencia Horizontal de Genes
WGS	Whole Genome Sequencing

3. RESUMEN

Salmonella enterica no tifoidea es uno de los principales agentes bacterianos de toxiinfecciones alimentarias a nivel mundial; sus vías de transmisión incluyen: el consumo de alimentos contaminados, contacto directo con animales infectados, y más infrecuentemente contacto persona-persona. Si bien este microorganismo se asocia mayoritariamente a cuadros autolimitados que no requieren de terapia antimicrobiana, en un pequeño porcentaje de casos pueden ocurrir infecciones invasivas graves que requieren de internación y tratamiento antibiótico. La creciente detección de cepas de *S. enterica* con múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos de importancia crítica para la salud humana se ha convertido en un problema para la salud pública. Este aumento se ha visto facilitado por la movilización de genes de resistencia a los antimicrobianos en distintos elementos genéticos móviles, transferibles tanto horizontal como verticalmente.

En tal sentido, nos propusimos estudiar la resistencia antibiótica en una colección de aislamientos de *S. enterica* obtenidos en Uruguay desde finales de la década de 1970 hasta principios de la década de 2020, y determinar qué elementos genéticos móviles estuvieron involucrados en tales cambios. Así, analizamos el genoma de 212 aislamientos de *S. enterica*, que abarcaban distintos serovares, y diferentes orígenes. Mediante estudios bioinformáticos se buscó la presencia de genes transferibles de resistencia antibiótica, de replicones plasmídicos, y de genes de virulencia. Se buscó la posible correlación entre la presencia/ausencia de los anteriores, con el serovar o el origen del aislamiento. Del mismo modo se buscó la existencia de vínculos entre genes de resistencia y los distintos elementos genéticos móviles. Asimismo, se estudió también la correlación entre el genotipo y el fenotipo de resistencia.

Se detectó la presencia de genes de resistencia antibiótica en 68/212 genomas analizados, y de estos, 20 eran multirresistentes. Estadísticamente, los serovares Typhimurium y Derby fueron los que presentaron una mayor media de genes de resistencia; por otro lado; si bien se hallaron genes de resistencia en aislamientos de origen animal, ambientales y de alimentos, la mayoría fueron recuperados a partir de muestras de origen humano, en particular coprocultivos. Se detectaron genes vinculados a resistencia a once familias distintas de antibióticos; en tal sentido, los genes de resistencia a aminoglucósidos fueron los más frecuentemente detectados (n=56), seguido por genes de resistencia a β -lactámicos (n=40) y genes de resistencia a fosfomicina (n=32). Por su parte, los estudios de correlación entre genotipo y fenotipo de resistencia mostraron que salvo para *fosA7* (fosfomicina), el resto de los genes conferían el fenotipo de resistencia esperado. Con relación a la resistencia a

antibióticos de importancia crítica, se encontraron genes codificantes para β -lactamasas pertenecientes a los cuatro grupos de Ambler. Dentro de las de clase A la más frecuentemente detectada fue TEM-1; sin embargo, por su relevancia a nivel clínico, cabría destacar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido como CTX-M-8, CTX-M-14, y CTX-M-15, de la β -lactamasa de clase C, CMY-2, y de la carbapenemasa de clase B, NDM-1. Por su parte, dentro de los mecanismos de resistencia transferible a quinolonas, los más frecuentemente detectados fueron alelos de Qnr (QnrA1, QnrB1, QnrB2 y QnrB19); no obstante, también se detectó la bomba de efujo OqxAB y la enzima Aac(6')-Ib-cr. Con relación a los mecanismos transferibles de resistencia azitromicina, por un lado, se detectó el gen codificante para la enzima ErmB; por otra parte, se detectó también la presencia del operón codificante de Mph(A).

En otro orden, se detectó la presencia de replicones plasmídicos en 162/212 genomas analizados, siendo IncF el grupo de incompatibilidad más frecuentemente detectado. No obstante, el principal replicón plasmídico asociado a la resistencia antibiótica fue IncI1 (n=16). Otros grupos de incompatibilidad plasmídica también asociados a la movilización de genes de resistencia fueron IncHI2A/HI2, IncC2, IncN y ColE-1-like.

Por su parte, la búsqueda de genes de virulencia mostró la existencia de variabilidad intra e interserovar. En este sentido, se observó una pequeña relación inversa entre el número de genes de virulencia y el de genes de resistencia, aunque este no fue estadísticamente significativo. Por otra parte, también se observó una correlación entre un mayor número de genes de virulencia y una mayor cantidad de grupos de incompatibilidad plasmídica; no obstante, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el número de genes de virulencia y el origen de las muestras.

La variación a lo largo del tiempo de la resistencia antibiótica en *S. enterica* en el Uruguay ha mostrado un comportamiento bimodal, en donde aquellos aislamientos recuperados al comienzo y al final del periodo estudiado presentaron una mayor media de dichos genes. Por otra parte, el resistoma y plasmidoma de *S. enterica* ha ido cambiando a lo largo del tiempo acompañando la epidemiología local de la resistencia. Además, se comprobó la circulación de genes de resistencia en aislamientos uruguayos de *S. enterica*, con antelación a su primer reporte a nivel mundial. Asimismo, pudimos ver como distintos eventos de coselección llevaron a la primera detección en Uruguay de una cepa de *S. Enteritidis* productora de NDM.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. *Salmonella* spp.

Salmonella enterica está integrada por serovares patógenos capaces de dar lugar a una variedad de cuadros clínicos en humanos y animales. Se trata de un patógeno primario y es uno de los principales agentes causales de enfermedades transmitidas por alimentos (Leekitcharoenphon P, et al., 2016).

La gran diseminación de *Salmonella* en el ambiente, su prevalencia en aumento en la cadena alimenticia, su virulencia y capacidad de adaptarse resultan en un gran impacto desde el punto de vista médico, la salud pública y la economía (Besser JM, 2017). Este microorganismo es capaz de persistir de manera asintomática en el aparato digestivo de una variedad de animales incluyendo muchos destinados al consumo humano (bovinos, suinos, y aves, entre otros) siendo liberados con las heces; de esta manera dichos animales se convierten en un reservorio capaz de contaminar carnes, leche, huevos y hortalizas cultivadas en suelos fertilizados con abono contaminado con *Salmonella* (Yue M, et al., 2014). El reservorio de este género bacteriano puede mantenerse a través de la transmisión entre animales, a través de vectores artrópodos (Olafson PU, et al., 2014), e incluso puede permanecer en el medio ambiente gracias a la formación de *biofilms* (Sha Q, et al, 2013). Asimismo, se ha evidenciado la capacidad de algunos serotipos de *Salmonella enterica* de internalizarse en las hojas de plantas comestibles, constituyendo así otra posible fuente para la transmisión de este patógeno (Goldberg D, et al., 2011). Taxonómicamente este género se divide en dos especies, *S. enterica* que contiene seis subespecies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) y *S. bongori*; a su vez los miembros de estas seis subespecies se dividen en más de 2650 serovariedades (serotipos) en base a los antígenos O (somático) y H (flagelar) (Issenhuth-Jeanjean S, et al., 2014). *S. enterica* subsp. *enterica* alberga a casi todos los serovares patógenos para el hombre, a excepción de enfermedades

humanas muy poco frecuentes causadas por las subespecies *arizonae* y *diarizonae*. Por otra parte, *S. bongori* y el resto de las subespecies de *S. enterica* se asocian principalmente a vertebrados poiquilotermos (Tanner JR, et al., 2018). Algunos serotipos como Typhi, Paratyphi A y Sendai se encuentran muy adaptados a los seres humanos y no tienen otros hospederos conocidos; a su vez serovares como Typhimurium y Enteritidis presentan un amplio rango de hospederos pudiendo infectar una gran variedad de animales y al ser humano (Feng Y, et al., 2019). Por el contrario, serovares como Dublín y Choleraesuis están muy adaptados a hospederos animales (vacas y cerdos, respectivamente), no obstante, son capaces de causar infecciones en humanos (Velasquez-Munoz A, et al., 2024; Le Xuan A, et al., 2024). En función del cuadro clínico que originan podemos dividir a los distintos serovares de *S. enterica* en dos grandes grupos: el grupo responsable por la fiebre tifoidea y el grupo denominado *Salmonella* no tifoidea (SNT). La fiebre tifoidea en el ser humano es una infección sistémica aguda del sistema reticuloendotelial asociada principalmente a *S. Typhi*, y en menor medida a otros serotipos como Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Sendai y Choleraesuis (Crump JA, 2019; Meiring JE, et al., 2023; Le Xuan et al., 2024). El segundo grupo por su parte presenta un amplio rango de hospedadores constituyendo un reservorio importante para infecciones en el ser humano (Han J, et al., 2024); No obstante, si bien el grupo SNT ha sido clásicamente vinculado a cuadros de gastroenteritis, en algunas regiones se registra un mayor número de casos invasivos por serotipos de SNT que de casos debidos a serotipos asociados a fiebre tifoidea (Balasubramanian R, et al., 2019).

4.2. Determinantes de Virulencia en *Salmonella enterica*

Las infecciones causadas por los serovares no tifoideos ocurren mayoritariamente a través de la ingesta de aguas o alimentos contaminados. Para sobrevivir al pasaje por el estómago *Salmonella* activa su sistema de respuesta de tolerancia al ácido (ATR) encargado de preservar la homeostasis del pH intracelular (Álvarez-Ordóñez A, et al. 2011). Posteriormente, *Salmonella* atraviesa la capa de mucus presente en la pared intestinal y se adhiere al epitelio

a través diversos factores de adhesión presentes en este microorganismo (Haraga M, et al., 2008). La siguiente etapa está marcada por la liberación en el citoplasma de la célula hospedadora de diversos efectores que resultan en cambios en el citoesqueleto del epitelio intestinal que culminan en la internalización de este microorganismo en compartimentos intracelulares fagosómicos denominados “vacuolas contenedoras de *Salmonella*” (SCV) en los cuales pueden sobrevivir y proliferar (LaRock DL, et al., 2015). Como consecuencia de ese proceso, se produce una respuesta inflamatoria marcada por la migración de células polimorfonucleares al intestino y la liberación de mediadores con actividad antimicrobiana; a consecuencia de esta respuesta inflamatoria se genera un microambiente en el cual la proliferación de *Salmonella* se ve favorecida por encima de la microbiota residente (dos Santos AMP, et al., 2018). La habilidad de este microorganismo para causar infección en humanos y en animales destinados al consumo está dada por la acción coordinada de múltiples factores de virulencia. A su vez, los distintos genes de virulencia suelen agruparse en regiones discretas del cromosoma de *Salmonella* y en plásmidos, que reciben el nombre de islas de patogenicidad (SPI). Hasta la fecha se han descrito 24 SPI, y los genes de virulencia presentes en éstas actúan mayoritariamente de manera sinérgica durante la infección por estos microorganismos (Sia CM, et al., 2025). La presencia de las distintas SPI varía de acuerdo con las especies, subespecies y serovares del género *Salmonella*, reflejando su historia evolutiva (Fig. 1). En este sentido las islas SPIs 1-5 están presentes en todos los serovares de *Salmonella*, mientras que las SPIs 19-23 (ausentes en *S. Typhi* y *S. Typhimurium*) solo se encuentran presentes en unos pocos serovares como Dublín, Gallinarum y Derby. Por su parte, solamente los efectores codificados en las islas SPI-1, 4, 9, 14 y 18, participan en la invasión de *Salmonella* a macrófagos y células epiteliales; los genes de virulencia codificados en las islas SPI-2, 3, 5-8,10-13 y 16, colaboran en la supervivencia en ambientes ácidos, facilitando la replicación intracelular y la evasión de la respuesta inmune del hospedador; por otro lado, la isla SPI-24 se encuentra presente en *S. Typhimurium* y sus genes de virulencia estaría asociados a la colonización del intestino (Wang M, et al., 2020; Han J, et al., 2024). Las islas SPI-1 y SPI-2 poseen un número grande de genes de virulencia

y ambas codifican para sistemas de secreción de tipo 3 (T3SS). A modo de ejemplo, solamente en los serovares Typhimurium, Typhi y Paratyphi A se han encontrado más de 40 efectores codificados en ambas islas; por otra parte, todos los serovares parecen tener un conjunto de efectores “core” (PipA, PipB, PipB2, SifA, SipA, SipB, SipC, SipD, SopB, SopD, SpiC, SptP, SseF, SseG, SseL, SteA y SteD), sugiriendo que juegan un papel crítico en la virulencia en los distintos hospedadores (Jonhson R, et al., 2018).

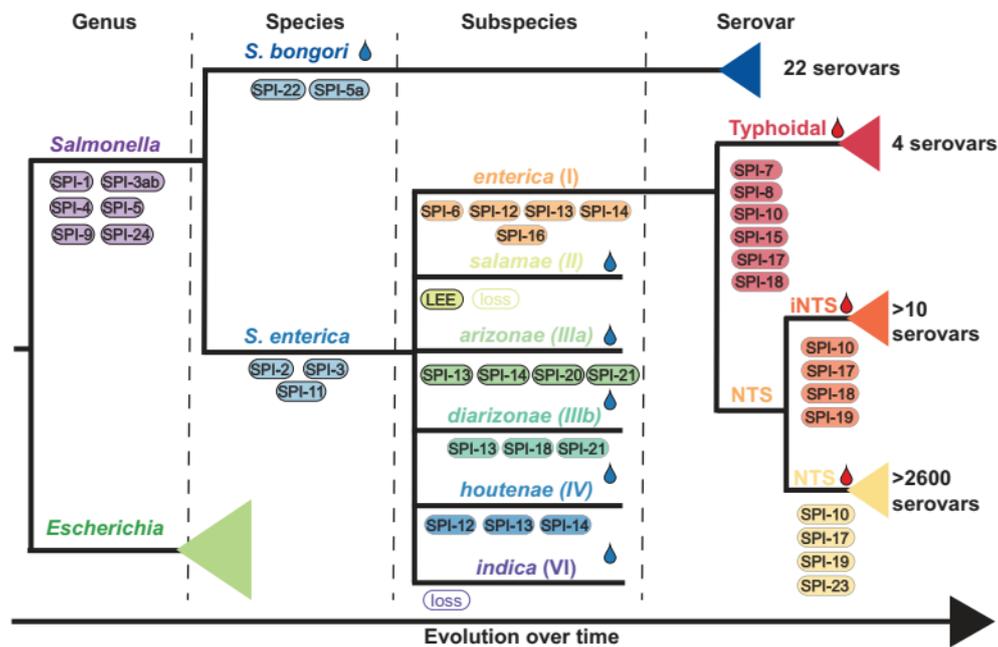


Figura 1. Evolución del género *Salmonella* marcado por eventos de ganancia (óvalos coloreados) y pérdida (óvalos vacíos) de islas de patogenicidad. Las distintas SPIs se muestran a nivel de género, especie, subespecie y serovar. Las gotas azules y rojas indican hospedadores poiquilotermos y homeotermos, respectivamente. Imagen tomada de Sia CM, et al., 2025.

4.2.1 Islas de Patogenicidad.

La isla SPI-1 abarca aproximadamente 40 kb y está presente en todas las especies de *Salmonella*. Entre otros, contiene los genes *avrA*, *invA*, *hilACD*, *org*, *sptP*, *spa*, *sipA-D*, *iag*, *prg*, *sit*, y *sic*, que codifican para un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS-1), sus proteínas regulatorias y proteínas efectoras; además codifica para reguladores transcripcionales que controlan la expresión de genes fuera de la SPI-1. Los reguladores y efectores de T3SS-1 participan en los proceso de colonización e invasión de las células epiteliales intestinales y

llevan a la necrosis y a reacciones inflamatorias en macrófagos. Además, estos efectores también regulan la exocitosis de *Salmonella* de las células hospedadoras facilitando su supervivencia y proliferación dentro de vacuolas (Lou L, et al., 2019). Por su parte, la isla SPI-2 contiene más de 40 genes distribuidos en cuatro operones. De estos, *ssa* codifica para el T3SS-2, *ssr* codifica para un sistema regulador, y *ssc* codifica para una chaperona molecular. El sistema de secreción T3SS-2 libera a través de la membrana vacuolar, más de 20 efectores en el citoplasma de la célula hospedadora, jugando así un papel esencial en la supervivencia de *Salmonella* en fagocitos y en células epiteliales. Además, algunos de estos efectores le permiten escapar a la acción bactericida de macrófagos y participan en la progresión hacia la infección sistémica (dos Santos AMP, et al., 2018). Los distintos factores de virulencia que participan en los procesos de invasión y supervivencia intracelular se muestran con mayor detalle en la figura 2. Como se mencionó previamente, las islas SPI-1 a SPI-5 están presentes en todos los serovares de *Salmonella*; las demás islas tienen una distribución dispar entre los distintos serovares e incluso entre distintas cepas. A diferencia de SPI-1 y SPI-2, las otras SPI no han sido estudiadas con tanto detalle, y sus principales detalles se resumen en la tabla 1.

4.2.2. Toxinas codificadas por *S. enterica*

Si bien la salmonelosis no es tradicionalmente considerada como un proceso infeccioso mediado por toxinas, algunos serovares de *Salmonella* pueden emplear toxinas ADP-ribosilantes bacterianas (bARTTs), para modificar la respuesta del hospedador y facilitar su supervivencia en dichos hospedadores. La más conocida de estas toxinas es SpvB, codificada en plásmidos de virulencia (ver más abajo), sin embargo, existen otros bARTTs de reciente descubrimiento: A) la toxina tifoidea se encuentra codificada en un EGM putativo en

la SPI-11; se trata una toxina heptamérica de tipo A₂B₅, la cual presenta dos subunidades A unidas covalentemente (PitA y CdtB), ligadas a un homopentámero de la subunidad B (PitB).

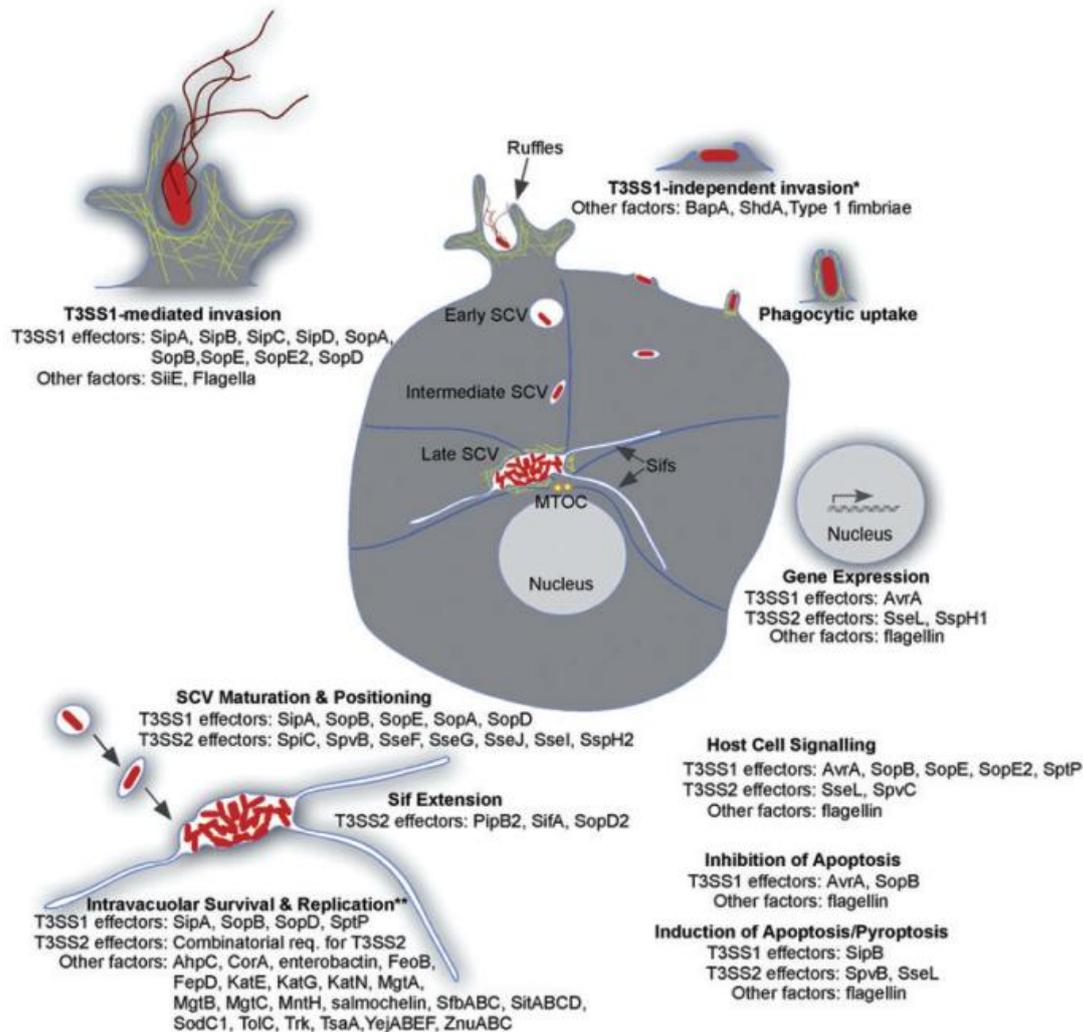


Figura 2. Esquema de algunos de los factores de virulencia que participan en los procesos de invasión y de supervivencia intracelular de *Salmonella*. SIF: Filamentos inducidos por *Salmonella*; SCV: Vacuolas contenedoras de *Salmonella*; MTOC: Centro organizador de microtúbulos; *: Mecanismo de invasión celular independiente del T3SS-1; **: Factores de virulencia con evidencia no concluyente que participarían en la supervivencia intracelular. Imagen tomada de Ibarra J, et al., 2009.

Su papel en la virulencia de *Salmonella* no se encuentra completamente dilucidado y se ha sugerido que, al menos para *S. Typhi*, la toxina tifoidea mediaría su supervivencia intracelular prolongada en células humanas y facilitaría la transmisión; B) la toxina ArtAB ha sido hallada en al menos 45 serovares distintos, y está codificada en profagos. También se trata de una toxina de tipo A-B, formada por una subunidad de ArtA y un pentámero de ArtB. Esta toxina es estructuralmente similar a la toxina PtxA (toxina pertussis) por lo que se presume que el

blanco celular de ArtAB también serían proteínas G del hospedador. De todos modos, su papel en la virulencia de *Salmonella* tampoco se encuentra del todo esclarecido (Cheng RA, et al., 2019).

Tabla 1. Resumen de las SPI-3 a SPI-24, mostrando sus principales genes de virulencia y su rol en la patogenia de la infección por *Salmonella enterica*. Datos extraídos de Wang M, et al., 2020 y Han J, et al. 2024

Isla de Patogenicidad (SPI)	Tamaño (kb)	Principales Genes de Virulencia	Función en la Virulencia
SPI-3	~17 kb	<i>mgtCB</i> , <i>misL</i>	Adaptación al ambiente intracelular; resistencia a estrés osmótico y a la carencia de magnesio.
SPI-4	~25 kb	<i>siiE</i> , <i>siiA-siiF</i>	Adherencia a células epiteliales; codifica un sistema secretor tipo I y una gran adhesina.
SPI-5	~7.6 kb	<i>pipA-D</i> , <i>sopB</i>	Modulación de la respuesta inflamatoria y secreción de fluidos intestinales.
SPI-6	~59 kb	<i>sci</i> , <i>tcf</i> , <i>perC</i> , <i>pagN</i>	Codifica un sistema de secreción tipo VI; participación en la competencia bacteriana y adhesión.
SPI-7	~134 kb	<i>viaAB</i> , <i>sopE</i> , <i>tviA-E</i>	Expresión del antígeno capsular Vi (en <i>S. Typhi</i>); evasión del sistema inmune y mayor virulencia sistémica.
SPI-8	~5 kb	Genes para bacteriocinas, y factores de adhesión	Presente en algunas cepas; función menos clara, relacionada con adhesión.
SPI-9	~16 kb	<i>sopD2</i> , <i>rck</i>	Invasión y resistencia a la fagocitosis; contribuye a la virulencia en modelos animales.
SPI-10	~33 kb	<i>sefA-sefD</i> , <i>prgH</i> , <i>prpZ</i>	Formación de fimbrias; adhesión y colonización.
SPI-11	~14 kb	<i>pagCD</i> , <i>msgA</i> , <i>raoN</i>	Supervivencia en macrófagos, y respuesta a condiciones ácidas y stress oxidativo intramacrofágico.
SPI-12	Tamaño variable	<i>sspH2</i> , <i>oafA</i> , <i>STM2239</i>	Participaría en la evasión de la respuesta inmune y en la patogenia
SPI-13	~13 kb	Genes codificantes para varios reguladores	Participaría en la supervivencia intracelular en macrófagos, y mejoraría el estado nutricional en <i>S. Enterica</i>
SPI-14	~9 kb	<i>loiA</i>	Aumentaría la capacidad de <i>S. Typhimurium</i> de invadir células epiteliales
SPI-15 a SPI-17	Entre 4.5 a 6.5 kb	Desconocido	Se desconoce el papel jugado por estas islas de patogenia en la virulencia de <i>Salmonella</i> .
SPI-18	~2.3 kb	<i>hlyE</i> , <i>STY1499</i>	HlyE participaría en el establecimiento de infecciones sistémicas por <i>S. Typhi</i>
SPI-19	~45 kb	Genes relacionados a la función del T6SS	Codifica un sistema de secreción tipo VI, con funciones que van desde mejorar el crecimiento competitivo en <i>S. Dublin</i> a aumento de citotoxicidad frente macrófagos en <i>S. Gallinarum</i> .
SPI-20	~34 kb	Genes relacionados a la función del T6SS	Codifica un sistema de secreción tipo VI.
SPI-21	~21 kb	Genes relacionados a la función del T6SS, y bacteriocinas putativas	Codifica un sistema de secreción tipo VI. Contribuiría a la muerte o inhibición de la microbiota residente
SPI-22	~20 kb	Genes relacionados a la función del T6SS	Codifica un sistema de secreción tipo VI. Contribuiría a la virulencia.
SPI-23	~23 kb	<i>potR</i> , <i>talN</i> , <i>zomB</i> , <i>furB</i> ,	Codifica para un sistema de secreción de tipo IV. Participarían en el tropismo celular en el hospedador.
SPI-24	~25 kb	<i>shdA</i> , <i>ratAB</i> , <i>sivIH</i>	Participaría en la adhesión, colonización e invasión de células en el ciego, ileon terminal, ganglios mesentéricos y bazo.

4.2.3. Plásmidos de virulencia

Al menos seis serovares de *Salmonella* (*Abortusbovis*, *Choleraesuis*, *Dublín*, *Enteritidis*, *Gallinarum/Pullorum* y *Typhimurium*) pueden albergar un plásmido de virulencia (pSV). Estos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad IncF y presentan tamaños que varían en

función del serovar (p.ej. 60 kb para *S. Enteritidis*, 95 kb para *S. Typhimurium* y hasta 110 kb para *S. Choleraesuis*) (van Asten AJ, et al., 2005). Una característica clave de los distintos pSV es la presencia de un operón de 8 kb altamente conservado llamado *spvRABCD* (*Salmonella* plasmid *virulence*); este operón puede potenciar la virulencia acelerando la tasa de replicación dentro de células hospederas durante el transcurso de infecciones extraintestinales. Asimismo, el pSV de algunos serovares de *S. enterica* porta genes adicionales que pueden contribuir a la patogenia, como el operón *pefBACD traT*, *rck* y *rsk* (Han J, et al., 2024). El operón *pefBACD*, presente en plásmidos de virulencia de los serovares Enteritidis, Typhimurium, Bovismorbificans y ParatyphiC Choleraesuis, codifica para fimbrias que se caracterizan por carecer de una adhesina en su extremo distal, y participan en la adhesión en el intestino delgado y formación de biofilms (Hurtado-Escobar GA et al., 2019). Por su parte, la evidencia experimental indica que el gen *rck* (resistance to complement killing) codifica para una proteína que además de inhibir la vía alternativa del complemento, puede actuar como invasina, afectar el ciclo celular y alterar la integridad del ADN de células epiteliales (Mambu J, et al., 2020). Asimismo, el producto del gen *rsk* (regulation of serum killing) está ligado a la regulación de la expresión del gen *rck*, mientras que el gen *traT* (además de formar parte de región de transferencia de pSV) codifica para una proteína de 27 kDa que confiere niveles discretos de resistencia al suero (Han J, et al., 2024). En otro orden, plásmidos pertenecientes a otros grupos de incompatibilidad (IncFIB, IncI, e IncX4, entre otros) han sido encontrados en aislamientos de *Salmonella enterica* portando genes de virulencia. En este sentido y a modo de ejemplo, en plásmidos de tipo IncFIB se han encontrado genes ligados a la captación de hierro como el sistema aerobactina (*iucABCD-iutA*) así como transportadores de hierro de tipo ABC (*sitABCD*); además, plásmidos pertenecientes a dicho grupo de incompatibilidad frecuentemente portan genes que codifican para bacteriocinas o colicinas (*cib*, *cia*, *imm*, entre otros) que le permiten a *Salmonella* competir con la microbiota intestinal (Khajanchi BK, et al., 2017). Del mismo modo, la presencia de genes codificantes para bacteriocinas como *cib*, *cia*, *cva* e *imm*, también ha sido descrita en plásmidos de tipo IncI1 (Kaldhone PR, et al., 2019). Por último, la sobreexpresión

de genes *virB/D4*, presentes en plásmidos de tipo IncX4, le confieren a *Salmonella* la capacidad de persistir dentro de macrófagos y células epiteliales intestinales (Gokulan K, et al., 2013)

4.3. Tratamiento de las infecciones por *Salmonella* spp.

Las guías terapéuticas actuales indican que solamente aquellos grupos con mayor riesgo de desarrollar infecciones invasivas por SNT deben recibir tratamiento antimicrobiano (neonatos, pacientes añosos, pacientes con enfermedades cardíacas y pacientes inmunocomprometidos). En tal sentido los antibióticos recomendados como primera opción son cefalosporinas de tercera generación (CTG) como la ceftriaxona, fluoroquinolonas como la ciprofloxacina, trimetoprim-sulfametoxazol, o amino penicilinas como amoxicilina (Shane AL, et al.; 2017). Asimismo, para las infecciones por serovares asociados a fiebre tifoidea y/o fiebre paratifoidea se agrega además el uso de macrólidos como la azitromicina (Gibani MM, et al., 2018). Con relación a las CTG, se trata de antibióticos β -lactámicos de amplio espectro empleados tanto en medicina humana como veterinaria. En tal sentido cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima, entre otras, son las CTG de mayor uso en la práctica médica para el tratamiento de infecciones severas por Enterobacteriales y por *Pseudomonas aeruginosa*. El principal mecanismo de resistencia a este grupo de antibióticos está dado por la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas de tipo AmpC, o por la producción de carbapenemasas (McEwen SA, et al., 2018).

Por otro lado, la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. En tal sentido, el uso indiscriminado de antibióticos tanto en la práctica médica como en la cría de animales para consumo humano ha llevado al surgimiento de serovares resistentes dentro del género *Salmonella* (Lamichhane B, et al., 2024), siendo los serovares como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Newport* los que han mostrado una mayor tasa de resistencia antimicrobiana (Medalla F, et al., 2016; Pitti M, et al., 2023). En tal sentido,

el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de EE. UU. reportó que el nivel de resistencia a ciprofloxacina ó a cefalosporinas de tercera generación en SNT se aproximan al 10% y al 3%, respectivamente. Por otra parte, sólo en dicho país, el nivel de no susceptibilidad a ciprofloxacina para *S. Typhi* alcanzó el 74% (Fig. 3) (<https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/nt-salmonella-508.pdf>).

4.3.1. Resistencia Antibiótica en *Salmonella enterica* en el Uruguay

En nuestro país los serovares Typhimurium y Enteritidis pertenecientes al grupo SNT son, en conjunto, la causa más frecuente de intoxicación alimentaria (Betancor L, et al., 2010). Desde 1971 *S. Typhimurium* ha sido uno de los principales causantes de salmonelosis humana en el Uruguay, pasando a ocupar el segundo lugar en frecuencia detrás de *S. Enteritidis* a partir de 1995. Esta situación epidemiológica es similar a la observada en otros países de América del Sur (Macedo-Viñas M, et al., 2009).

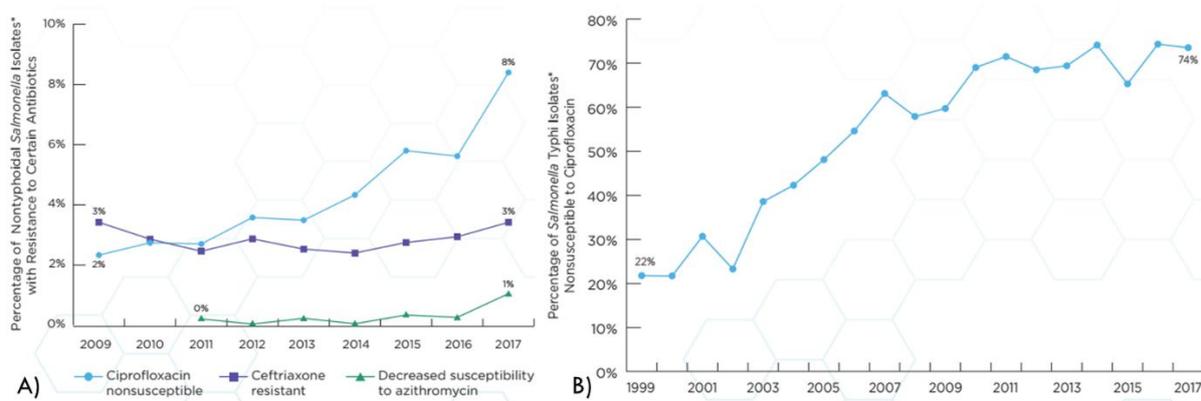


Figura 3. Evolución temporal de la resistencia a los antibióticos recomendados como tratamiento primario para los casos de salmonelosis humana. A) niveles de resistencia en aislamientos de *Salmonella* No Tifoidea a ciprofloxacina (círculos celestes), a ceftriaxona (cuadrados azules) y a azitromicina (triángulos verdes). B) niveles de resistencia a ciprofloxacina en aislamientos de *S. Typhi*. Imágenes tomadas de <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/2019-ar-threats-report-508.pdf>

Con relación a la resistencia a los antibióticos, el estudio de este fenómeno en aislamientos de *S. enterica* tanto de origen humano como animal ha producido abundante información. En tal sentido, en el año 2006 se describió la presencia de una nueva BLEE, TEM-144, en aislamientos de *S. Derby*; dicha enzima estaba codificada en un plásmido pequeño de tipo ColE1, que a la postre fue caracterizado completamente (Vignoli R, et al., 2006).

Posteriormente, se analizó la evolución de la resistencia a los antibióticos y la presencia de integrones en aislamientos humanos de *S. Typhimurium* recolectados hasta el año 2000 (Macedo-Viñas M, et al., 2009). Luego, en el año 2010, y en el marco de un convenio con el Wellcome Trust Sanger Institute, se describió la prevalencia en nuestro país de *Salmonella enterica* en aves de consumo y en huevos, y se estudió el fenotipo de resistencia en dichas muestras; en tal sentido, se encontró poca resistencia entre los aislamientos analizados, principalmente resistencia a ácido nalidíxico en *S. Derby* y un par de aislamientos de *S. Panamá* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Betancor L, et al., 2010). En el año 2012 se reportó la existencia del primer aislamiento en América del Sur de *S. Enteritidis* productora de la BLEE CTX-M-14, junto con una caracterización parcial del plásmido que portaba el gen para dicha enzima (Bado I, et al., 2012). Por otra parte, en el año 2013 se reportaron los primeros aislamientos a nivel sudamericano de *S. Typhimurium* productora de la cefamicinasa CMY-2, que estaba codificada en un plásmido conjugativo de tipo IncI1 (Cordeiro NF, et al., 2013). Posteriormente, en el año 2016 se realizó un análisis de los mecanismos de resistencia a quinolonas y cefalosporinas de tercera generación en aislamientos humanos de *S. enterica* recolectados durante el periodo 2011-2013; en dicho estudio se encontró que ~18% de los aislamientos no eran susceptibles a ciprofloxacina, mientras que solo un 1.6% de los aislamientos mostraron resistencia a CTG. Dentro de los genes de resistencia a dichas familias de antibióticos, se encontró la presencia de *qnrB19* y *qnrB2* (resistencia a quinolonas), y de los genes *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{SHV-2} y *bla*_{CMY-2} (resistencia a CTG) (Cordeiro NF, et al., 2016).

Por otra parte, recientemente se publicó un estudio a partir de aislamientos de *S. enterica* de origen bovino, en el cual los niveles de no sensibilidad a ciprofloxacina eran superiores a 75%, mientras que los niveles de no susceptibilidad a otros antibióticos fueron de 67% para tetraciclina, 85.3% para estreptomicina y 20% para nitrofurantoína, entre otros. Si bien, se encontraron cepas portando el gen *qnrB19* en muestras de origen bovino, en dicho estudio el único gen de resistencia a β -lactámicos detectado fue *bla*_{TEM-1B} (Casaux ML, et al., 2023).

4.4. Transferencia Horizontal de la Resistencia Antimicrobiana

Dentro del orden Enterobacterales los genes de resistencia a los antibióticos se encuentran a menudo en elementos genéticos móviles (Davies J, et al., 2010). A grandes rasgos, estos elementos genéticos móviles pueden dividirse en dos grandes grupos: a) aquellos que son transmisibles de una célula a otra (elementos genéticos móviles intercelulares), y b) aquellos que no pueden transferirse por sí mismos, pero pueden ser transferidos luego de haberse integrado a miembros del primer grupo (elementos genéticos móviles intracelulares). Dentro del primer grupo se encuentran plásmidos, bacteriófagos y elementos conjugativos integrativos (ICEs); por otra parte, el segundo grupo está integrado por transposones, secuencias de inserción, integrones e intrones (Siguier P, et al., 2014). Todos estos elementos genéticos móviles juegan un papel preponderante en la transferencia horizontal de genes (THG) (Daubin V, et al., 2016). La THG conlleva profundas implicancias evolutivas; en primer lugar, permite la recombinación homóloga entre cepas o especies cercanamente relacionadas; en segundo lugar, lleva a la integración de nueva información genética, permitiendo así una rápida adaptación a nuevos ambientes o a condiciones ambientales desfavorables; en tercer lugar, la THG participaría también en el establecimiento de procesos de cooperación microbiana (Smillie C, et al., 2010).

A grandes rasgos, la THG puede llevarse a cabo por tres mecanismos distintos: transformación, transducción y conjugación (Fig. 4). Aunque la transducción fágica ha sido la principal fuente de variación genética en *Salmonella* spp. (Porwollik S, et al., 2003), la conjugación es el mecanismo más relevante en la adquisición de la resistencia antimicrobiana (McMillan EA, et al., 2020; Oladeinde A, et al., 2021). En tal sentido, se conocen dos modos de conjugación que difieren tanto en el tipo de ADN translocado (ADN monocatenario - ADNmc vs. ADN bicatenario - ADNbc), como en la complejidad del sistema de transporte. Ambos sistemas conjugativos se encuentran codificados ya sea en plásmidos o insertos en

el cromosoma bacteriano como elementos conjugativos integrativos (Guglielmini J, et al., 2012).

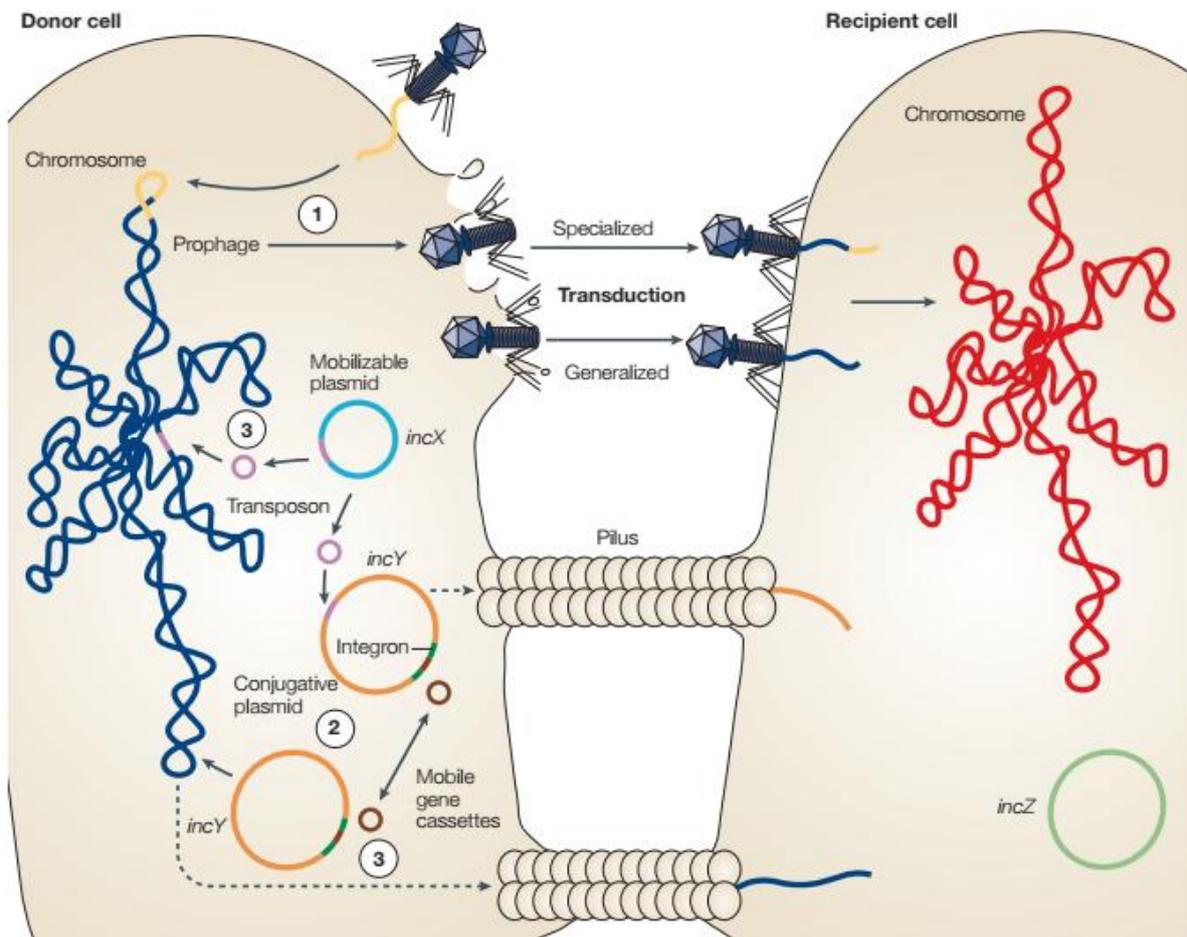


Figura 4. Mecanismos bacterianos de THG. 1) Transducción: el ADN fágico se inserta en el cromosoma bacteriano como profago; luego durante la replicación puede darse la encapsidación de ADN del hospedador, que posteriormente infectará a una célula susceptible, en la cual el nuevo ADN se recombinará con el cromosoma de la célula receptora. 2) Conjugación: plásmidos de gran tamaño emplean una estructura proteica (*pilus*) para establecer un puente entre bacterias y transferirse a una célula receptora; alternativamente, plásmidos pequeños pueden emplear la maquinaria conjugativa de los anteriores para poder transferirse a una nueva célula receptora. 3) Transposición: los transposones pueden integrarse a nuevos lugares en el cromosoma o en plásmidos; a su vez, los integrones pueden incorporar unidades discretas de ADN (*cassettes*) mediante recombinación no homóloga. Imagen tomada de Frost LS, et al., 2005.

4.4.1. Integrones

Los integrones son elementos genéticos movilizables que permiten la integración/escisión y expresión de moléculas cíclicas, exógenas, de ADN, denominados genes *cassette* (Bennet PM, 1999). Los componentes estructurales básicos de los integrones necesarios para la captura y expresión de dichos genes *cassette* son: a) un gen *intl* que codifica para una

integrasa perteneciente a la familia de las tirosina-recombinasas; b) un sitio de recombinación *attI*, para el cual la integrasa tiene afinidad; y c) un promotor orientado corriente abajo (P_c) que permite la expresión de los genes capturados (Tavares RDS, et al., 2025). Mediante un mecanismo de recombinación específica de sitio, la integrasa IntI es capaz de incorporar genes *cassette* a través del reconocimiento de dos sitios específicos, el *attI* mencionado previamente y un sitio denominado 59-be (elemento de 59 bases) o *attC* que forma parte de la estructura del gen *cassette* (Tavares RDS, et al., 2025). Este mecanismo de recombinación inserta a los nuevos *cassettes* en la posición proximal a la integrasa y al promotor P_c . No obstante, además de la incorporación de nuevos genes puede darse también la escisión de *cassettes* como círculos cerrados mediante eventos de recombinación entre los sitios *attI-attC* o entre *attC-attC* (Fig. 5A) (Richard E, et al., 2022). Los integrones pueden agruparse en cinco clases diferentes, todas vinculadas a la resistencia antibiótica. Así, aquellos pertenecientes a las clases 1, 2, y 3 son frecuentemente hallados en el ámbito clínico, mientras que aquellos pertenecientes a la clase 4 están asociados al elemento SXT presente en *Vibrio cholerae*. Por su parte, los integrones pertenecientes a la clase 5, han sido detectados en el plásmido pRSV1 de *Aliivibrio salmonicida* (Ali N, et al., 2024).

Si bien los integrones no son móviles per se, su asociación a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, sumado a la capacidad de integrar genes de resistencia, ha llevado a su rápida dispersión entre los distintos géneros bacterianos expuestos a los antibióticos (Richard E, et al., 2022). En este sentido, los integrones de clase 1 son los más diseminados, estando presentes hasta en un 59% de los patógenos Gram negativos aislados en contexto clínico, y pueden acarrear un número variable de genes de resistencia a los antibióticos (Escudero JA, et al., 2015). Estos integrones se caracterizan por presentar dos regiones conservadas, un extremo 5' conservado (5'CS) compuesto por el gen *intl1*, el promotor P_c y el sitio *attC*, y un extremo 3' conservado (3'CS) caracterizado por la presencia de los genes *qacEΔ1* y *sul1*; el arreglo de genes *cassette* inserto entre estas dos regiones recibe el nombre de región variable. Cabe mencionar que existen integrones de clase 1 en

los cuales el tándem *qacE11* y *sul1* ha sido reemplazado por genes como *qacH* o *sul3*, o que carecen completamente de la región 3'CS (Kaushik M, et al., 2018). Por otra parte, se han descrito lo que se conoce como integrones complejos de clase 1; estos se caracterizan por la presencia de la región 5'CS y una versión más corta la región 3'CS. Esta a su vez se continúa con una secuencia de inserción de tipo ISCR seguida de genes de resistencia (que no constituyen verdaderos *cassettes* ya que carecen de sitio *attC*), y corriente abajo presentan una segunda región 3'CS (Toleman MA, et al., 2006).

Los integrones de clase 2, por lo general se asocian a la familia de transposones Tn7 y cuya región 3'CS contiene cinco genes funcionales del transposón que median la movilidad del integrón. El extremo 5'CS de estos elementos genéticos presenta por lo general un pseudogen debido a la presencia de un codón de terminación interno que da lugar a un polipéptido más corto y carente de función integrasa. En tal sentido, la región variable de estos integrones suele estar bastante conservada en función de la pérdida de función de dicha integrasa. De todos modos, se han descrito variantes de estos integrones que presentan una integrasa funcional (Deng Y, et al., 2015).

Por otra parte, los integrones de clase 3 pertenecen al mismo clado de los de clase 1 (proteobacterias de suelos/agua dulce). La integrasa de clase 3 también es capaz de integrar *cassettes* circularizados y de escindir genes integrados, aunque con una tasa significativamente inferior a la de los integrones de clase 1. A diferencia de estos últimos, los de clase 3 han sido detectados en unas pocas especies (Fig. 5B) (Kaushik M, et al., 2018).

Cabe mencionar además, la existencia de superintegrones. Estos elementos genéticos son componentes esenciales de numerosas γ -Proteobacterias y han sido identificados en numerosas especies de las familias Vibrionaceae y Xantomonadaceae, y en una rama del orden Pseudomonadales. Todos comparten las mismas características, poseen un gran número de *cassettes* (entre 20 a 179) y presentan una alta homología entre los sitios *attC* (>80%). Por otra parte, si bien estos EGM presentan una organización estructural similar a la de los integrones movilizables, los superintegrones están insertos en el cromosoma de los

microorganismos mencionados anteriormente y no se asocian a otros elementos genéticos móviles (Hall RM, et al., 2007; Krin E, et al., 2014).

Con relación al género *Salmonella*, en nuestro país ya se han estudiado y caracterizado diversos integrones de clases 1 y 2 presentes en enterobacterias de origen humano y animal (Macedo M, et al., 2009; Bado I, et al., 2010; Cordeiro NF, et al., 2020).

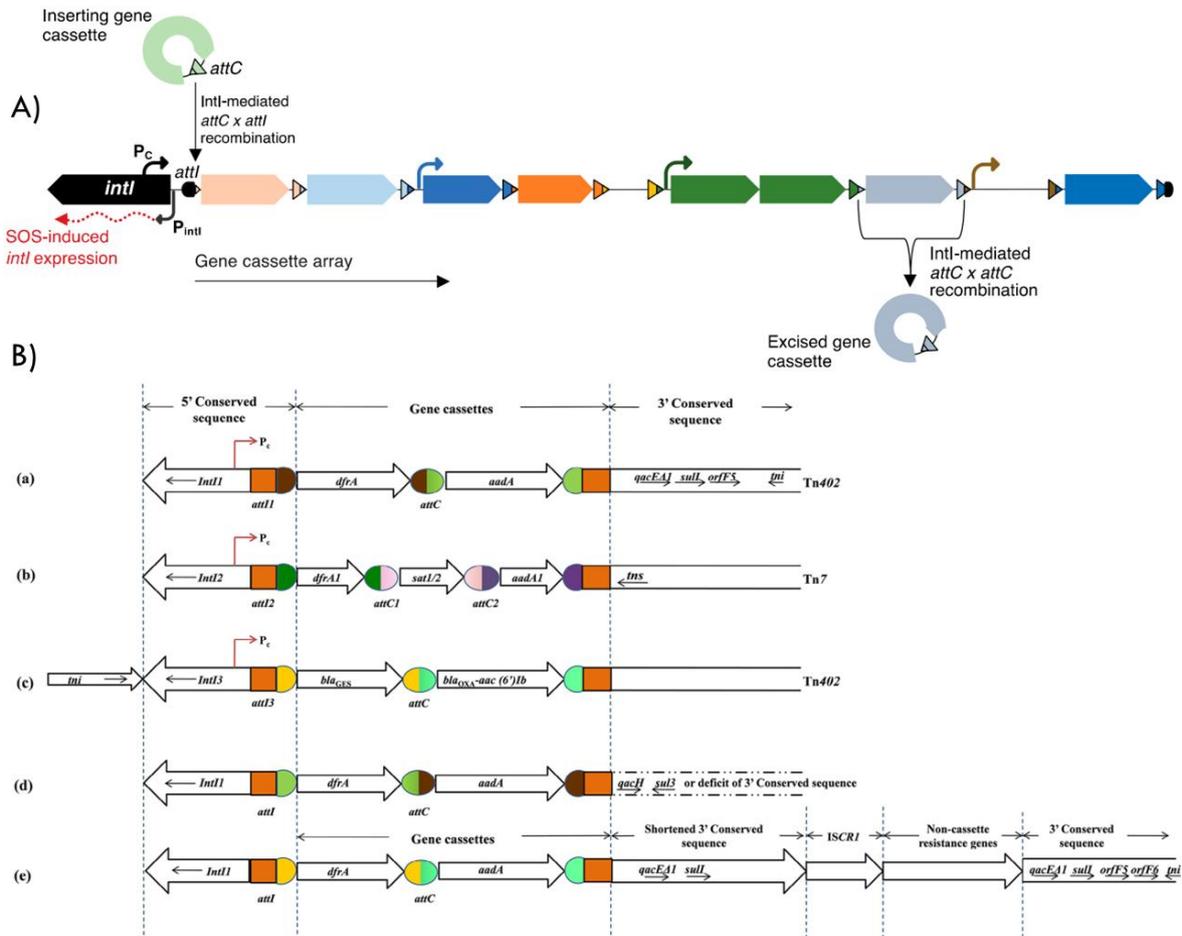


Figura 5A) Estructura y función típica de los integrones, que incluye un gen que codifica para una integrasa (*intI*), un sitio de recombinación (*attI*), un arreglo de genes *cassette* que presentan un sitio de recombinación designado *attC*. La integrasa cataliza la inserción y la escisión de genes *cassette* a través de eventos de recombinación entre los sitios *attI* x *attC* y *attC* x *attC*, respectivamente (Imagen tomada de Ghaly TM, et al., 2021). En el panel B) se muestra un esquema comparativo entre integrones de clase 1 (a), integrones de clase 2 (b), integrones de clase 3 (c), integrones atípicos de clase 1, es decir con un extremo 3'CS distinto o totalmente ausente (d), e integrones complejos de clase 1 (e) (Imagen tomada de Kaushik M, et al. 2018).

4.4.2. Elementos Transponibles

Los transposones, o elementos transponibles (ET) son segmentos discretos de ADN que pueden movilizarse de un lugar a otro dentro de una misma molécula de ADN, o entre

diferentes moléculas de ADN; estos ET pueden dividirse en distintas categorías: secuencias de inserción (IS), transposones compuestos, transposones no compuestos, y el fago transponible MU (Babakhani S, et al., 2018) (Fig. 6). Los distintos ET se movilizan mediante un mecanismo de “corte y pegado” (el más frecuente), existiendo además otros dos mecanismos denominados “copia y pegado” y “copiado y salida, pegado y entrada”. Las transposasas son endonucleasas sitio-específicas que reconocen secuencias específicas que corresponden a ambos extremos del transposón; algunas reconocen secuencias cortas en cada extremo denominadas como Repetidos Invertidos o Repetidos Terminales Invertidos. Por otra parte, la mayoría de los sistemas de transposición por “corte y pegado” generan, durante la reparación de los cortes de ADN introducidos al momento de la integración, duplicaciones del sitio blanco denominados Repetidos Directos (Hickman AB, et al., 2016). En el caso de transposones replicativos (p.ej. Tn3), si el sitio blanco se encuentra en una molécula de ADN distinta a la del transposón donante, se genera una estructura intermediaria conocida como cointegrado; esta estructura es luego “resuelta” o separada en dos moléculas (cada una conteniendo una copia del transposón), por una resolvasa (Rice PA, 2015).

Los transposones no compuestos generalmente poseen tamaños que oscilan entre 2,5 a 60 Kb y usualmente presentan invertidos repetidos terminales largos; además pueden portar genes accesorios que confieren una ventaja selectiva a sus hospedadores bacterianos, como resistencia a los antibióticos, a metales pesados o a fagos, entre otros. Por otra parte, las secuencias de inserción (IS) son elementos móviles compactos generalmente flanqueados por invertidos repetidos, presentando uno o dos genes que codifican para transposasas (Partridge SR, 2011). Los transposones se diferencian de las IS porque los primeros portan genes accesorios (p.ej.: resistencia a antibióticos) no involucrados en la regulación de los eventos de transposición (Siguier P, et al., 2014).

Las distintas IS se pueden agrupar según el motivo aminoacídico del sitio blanco y son designadas por los aminoácidos presentes en dicho sitio: DDE (Asp, Asp, Glu), DEDD (Asp, Glu, Asp, Asp), HUH (His, residuo hidrofóbico, His) y serina-transposasas (Siguier P, et al.,

2015). Si bien las IS *sensu stricto* no portan genes de resistencia, en caso de que dos copias de una misma IS (o dos IS cercanamente relacionadas) se inserten a ambos lados de un gen, pueden “capturarlo” dando lugar a la formación de un transposón compuesto capaz de moverse como una unidad (Partridge SR, 2011). Por otra parte, las IS presentan promotores que pueden expresar o aumentar los niveles de expresión de genes adyacentes (Vandecraen J, et al., 2017). Un claro ejemplo de esto lo constituye la β -lactamasa de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M, aunque originalmente se encuentran en el genoma de *Kluyvera* sp. su presencia no confiere resistencia a oximino cefalosporinas, pero la movilización (mediada por IS) del gen que codifica para dichas enzimas a otras enterobacterias se traduce en resistencia a dicho grupo de antibióticos (Lartigue MF, et al., 2006).

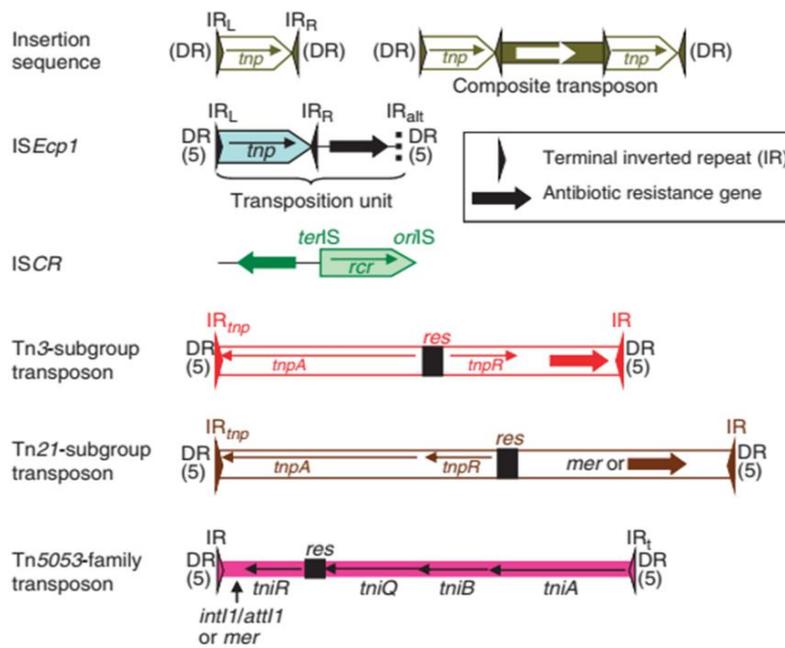


Figura 6. Comparación entre secuencias de inserción y transposones involucrados en la captura y movilización de genes de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Los genes *tnp* y *tni* median funciones de transposición. IR_L e IR_R son invertidos repetidos izquierdo y derecho, respectivamente. IR_{alt} , IR alternativo; *rcr*, es replicasa de círculo rodante; *oriS*, origen de elementos ISCR; *res*, blanco de la resolvasa. El largo de los repetidos directos (DR) figura entre paréntesis. Figura adaptada de Partridge SR, 2011.

Otra particularidad de las IS es que la presencia en el genoma de una determinada IS facilita la adquisición de nuevas copias de esta y facilita la acumulación de nuevos genes de resistencia; un claro ejemplo en este sentido es la IS26, ampliamente diseminada entre las enterobacterias (He S, et al., 2015; Harmer CJ, et al., 2015; Harmer CJ, et al., 2016).

Por último, hay dos tipos de IS con un mecanismo inusual de captura y movilización de genes de resistencia; específicamente, aquellas de tipo ISEcp1 e ISCR. A diferencia de otras

secuencias de inserción, las anteriores requieren de una sola copia de dicho elemento genético para la captura, movilización y expresión de genes de resistencia, o de segmentos adyacentes de ADN (Partridge SR, 2011; Lallement C, et al., 2018) (Fig. 6). De manera similar a lo mencionado con relación a los integrones, la asociación entre *ISEcp1* e *ISCR* y genes de resistencia a antibióticos en Enterobacterales también ha sido reportada en nuestro país (Cordeiro NF, et al., 2013; Bado I, et al., 2018; Papa-Ezdra, et al., 2021).

4.4.3. Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos móviles que se replican y se transmiten independientemente del cromosoma y que además existen de forma estable con este. Los plásmidos poseen genes que aseguran su persistencia y su transmisión, los cuales a menudo resultan desventajosos para el hospedador (p.ej.: sistemas toxina-antitoxina); sin embargo, los plásmidos juegan un papel muy importante en la evolución bacteriana al transferir características que redundan en un beneficio para la célula que los porta. En tal sentido, muchos de los genes portados en plásmidos permiten metabolizar compuestos tóxicos para las bacterias, o permiten la interacción de las bacterias con seres eucariotas multicelulares. Los plásmidos presentan una amplia diversidad, difieren en el número de copias por célula, el contenido G+C, el contenido de genes, el rango de hospedadores y la topología del ADN (lineal o circular), entre otras características. No obstante, estos elementos genéticos móviles pueden clasificarse más extensamente en función de las proteínas de replicación y movilidad. Así, podemos encontrar plásmidos conjugativos, movilizables y no movilizables (Rodríguez-Beltran J, et al., 2021). Otra manera de poder agrupar a los plásmidos es según el grupo de incompatibilidad al cual pertenecen. En tal sentido, dos plásmidos distintos incapaces de coexistir de manera estable en una población bacteriana en crecimiento son considerados incompatibles (Novick RP, et al., 1976). Dicha incompatibilidad surge del acoplamiento producido entre los sistemas de inicio de replicación y los sistemas de partición de ambos plásmidos, que conduce a que ambas moléculas de ADN sean percibidas como una sola (Partridge SR, et al., 2018) (Tabla 2). Actualmente se han descrito al menos 28 clases de

grupos de incompatibilidad en Enterobacterales, 14 en *Pseudomonas* y aproximadamente 18 en *Staphylococcus*; es esperable que dicho número se vea incrementado con el correr del tiempo dada la creciente disponibilidad de secuencias plasmídicas en bases de datos públicas (Rozwandowicz M, et al., 2018). No todas las familias plasmídicas están representadas con la misma frecuencia en distintas bacterias, siendo algunas familias más prevalentes que otras; algunas incluso presentan una distribución diferencial según se trate de microorganismos patógenos o comensales (Mc Millan EA, et al., 2020).

Tabla 2. Principales características de plásmidos de resistencia.

Replicón	Relajasa	Tamaño (Kb)	Nº copias	Transferencia	Rango de hospedadores
IncA/C	MOB _H	18-230	Bajo	Conjugación	Estrecho
IncF	MOB _F	45-200	Bajo	Conjugación	Enterobacterales
IncH	MOB _H	75-400	Bajo	Conjugación	Muy amplio (Enterobacterales, <i>Aeromonas</i> sp., <i>Vibrio</i> sp., etc.)
IncK, IncB/O IncZ	MOB _P	80-150	Bajo	Conjugación	Estrecho
IncI	MOB _P	50-250	Bajo	Conjugación	Estrecho
IncL/M	MOB _P	50-80	Bajo	Conjugación	Amplio
IncN	MOB _F	30-70	Bajo	Conjugación	Amplio
IncP	MOB _P	70-275	Bajo	Conjugación	Amplio
IncQ	MOB _Q	8-14	Medio (4-12 copias)	Movilizable	Amplio (α , β , δ , y γ -Proteobacterias y Cianobacterias)
IncR	No tienen	40-160	Bajo	Movilizable	Amplio
IncT	MOB _H	~217	Bajo	Conjugación	Estrecho
IncU	MOB _P	29-60	Bajo	Conjugación	Amplio (α , β y γ -Proteobacterias)
IncW	MOB _F	~40	Bajo	Conjugación	Amplio
IncX	MOB _P	30-50	Bajo	Conjugación	Estrecho
Col	MOB _P	6-40	1-20 copias	Movilizable	-

(Adaptada de Rozwandowicz M, et al., 2018)

A su vez, existen plásmidos que no son clasificables mediante el esquema PBRT (PCR-Based Replicon Typing) mencionado previamente. Una posible explicación de ello es que los continuos eventos de mutaciones y rearrreglos que experimentan los plásmidos pueden darse en regiones empleadas para la tipificación plasmídica; esto puede dar lugar al surgimiento de plásmidos nuevos derivados de otros conocidos, no tipificables mediante este sistema (Orlek A, et al., 2107; Rozwandowicz M, et al., 2018).

4.4.3.1. Plásmidos Conjugativos

Estos plásmidos consisten en un esqueleto compuesto por cuatro grandes módulos dedicados a la estabilidad, la replicación, la propagación y la adaptación; además, pueden incluir un bloque de elementos accesorios que codifican para características que redundan en un beneficio para la célula hospedadora. En función del número de genes requeridos para la maquinaria conjugativa y la estabilización, estos plásmidos suelen presentar tamaños iguales o superiores a 34 Kb (Norman A, et al., 2009).

Los sistemas involucrados en la conjugación de ADNmc incluyen dos grandes complejos proteicos: relajasomas y sistemas de secreción de tipo IV (SST4). El pasaje de elementos genéticos móviles a través de las membranas de las células donante y receptora se realiza con el SST4. En proteobacterias, los SST4 son complejos de proteínas que involucran una ATPasa, proteínas encargadas del apareamiento (*mating-pair formation* – MPF) que forman el canal de transporte, y un *pilus* que se une a la célula receptora (Álvarez-Martínez CE, et al., 2009). Por su parte, el relajasoma está compuesto por una relajasa (MOB) más proteínas auxiliares; la relajasa produce un corte en el ADNbc y se une al ADNmc en el origen de transferencia (*oriT*). Además del relajasoma, otro componente esencial en la maquinaria de conjugación es la proteína de acoplamiento de tipo 4 (PAT4). El PAT4 se une al complejo ADN-relajasa y la acopla al SST4, usando ATP para translocar el complejo a través de la membrana interna (Garcillán-Barcia MP, et al., 2009). Por su parte, son los SST4 los que se encargan de formar el *Pili F* cuyo ensamblaje y funcionamiento depende de la expresión de los genes *tra* (Arutyunov D, et al., 2013). Dentro de estos, la TraA es la pilina y TraV una

proteína de membrana externa que formaría un complejo TraV/TraK/TraB transmembrana (Harris RL, et al., 2001). Mutantes en cualquiera de estas proteínas generan ausencia de formación de *pili* y la actividad donante de ADN se torna indetectable. Por otra parte, los plásmidos conjugativos a menudo codifican también para una proteína de exclusión de ingreso que impiden que la célula huésped actúe como receptora para el mismo plásmido, o para plásmidos cercanamente emparentados (Garcillán-Barcia MP, et al., 2008).

4.4.3.2. Plásmidos Movilizables

Los plásmidos movilizables tienden a tener un tamaño menor al de los plásmidos conjugativos ya que carecen de los genes necesarios para la maquinaria del MPF (Smillie C, et al., 2010); sin embargo, la movilización en trans de estos plásmidos ocurre cuando se valen del sistema conjugativo codificado por otro plásmido presente en la misma célula. En tal sentido, la relajasa de los plásmidos movilizables interactúan con su *oriT* y luego el filamento nucleoproteico es transferido por el SST4 del plásmido conjugativo (Coluzzi C, et al., 2022) (Fig. 7i). Asimismo, se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la presencia simultánea de plásmidos conjugativos y movilizables en una misma célula bacteriana, lo que sugiere que los primeros podrían facilitar la adquisición y/o la retención de los segundos (San Millan A, et al., 2014).

4.4.3.3. Plásmidos “No Movilizables”

Por otra parte, a una tercera categoría corresponderían a aquellos plásmidos que no son ni conjugativos ni movilizables. No obstante, estos plásmidos podrían diseminarse dentro de una población bacteriana por distintos mecanismos como: i) transducción plasmídica, dada cuando un fago encapsida ADN plasmídico en partículas virales e infecta a otra célula bacteriana; una vez en el citoplasma el plásmido puede ser escindido y recircularizarse nuevamente; ii) transformación plasmídica, es decir la adquisición por parte de bacterias de ADN plasmídico libre; iii) vesiducción, es decir la transferencia de material plasmídico a través de vesículas (que tendría particularmente alta frecuencia en *biofilms*); iv) conducción

plasmídica, en el cual plásmidos “no movilizables” formarían un cointegrado mediante recombinación con plásmidos conjugativos o movilizables, y luego dicho cointegrado sería transferido a una nueva célula hospedadora en la cual se daría la resolución (separación) de dicha estructura genética (Rodríguez-Beltrán J, et al., 2021) (Fig. 7ii).

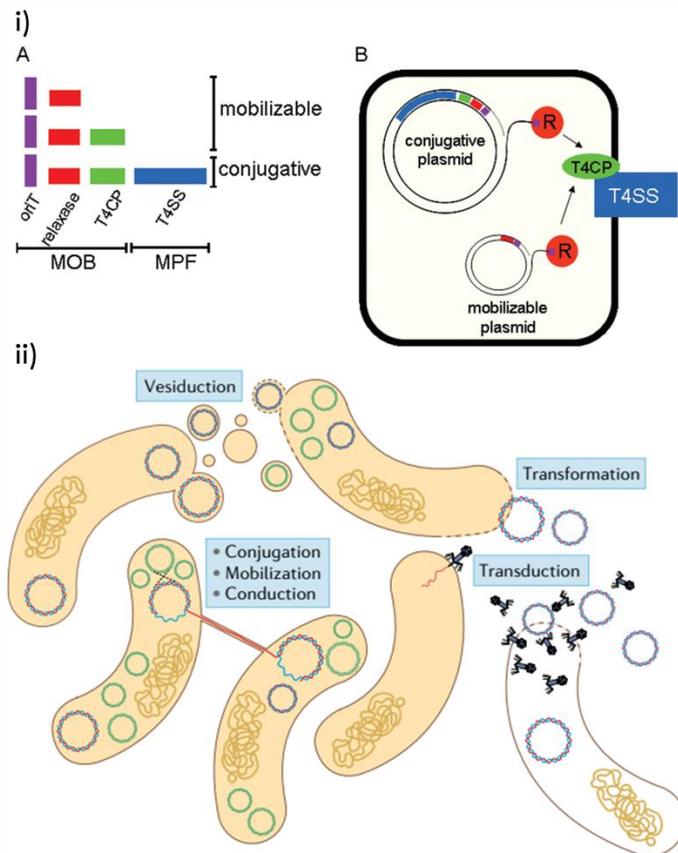


Figura 7i) El panel A muestra un Esquema de la maquinaria empleada por plásmidos conjugativos y movilizables para su transferencia a una nueva célula bacteriana. *oriT* es el origen de transferencia; T4CP es la proteína de acoplamiento de tipo 4 (PAT4); T4SS en complejo de 12 a 30 proteínas designado sistema de secreción de tipo IV (SST4); MPF es un conjunto de proteínas encargadas del acoplamiento bacteriano. El panel B muestra algunos de los eventos esenciales durante el proceso de conjugación. Figura 7ii) Mecanismos implicados en la movilidad plasmídica. La conjugación y la movilización conjugativa facilitan la diseminación de plásmidos conjugativos y movilizables, respectivamente. Plásmidos no movilizables podrían ser transferidos por vías como transducción, conducción, transformación, vesiducción y transmisión a través de nanotubos. Imagen adaptada de Smillie C, et al., 2010 y Rodríguez-Beltrán J, et al., 2021.

4.4.4. Elementos Conjugativos Integrativos (ICEs)

Los ICEs son elementos genéticos móviles autotransmisibles que codifican su propia maquinaria conjugativa y los elementos regulatorios que controlan su escisión del cromosoma y su transferencia (Ryan MP, et al., 2016). Los ICEs presentan dos estados, un estado integrado en el cual su ADN reside en el cromosoma de su hospedador, y un estado conjugativo en el cual su ADN se ha escindido del cromosoma y puede potencialmente ser transferido mediante conjugación a una nueva célula. El proceso de integración es a través de recombinación sitio específica entre dos repetidos directos que constituyen los sitios de unión: *attB* en el cromosoma y *attI* (o *attP*) en el ICE circularizado. La integración en sí es

catalizada por la integrasa y genera durante el proceso repetidos directos en los extremos del elemento integrado (*attL* a la izquierda y *attR* a la derecha). El proceso de escisión también ocurre mediante recombinación específica de sitio, pero entre repetidos conservados dentro de *attL* y *attR*, dando como resultado una molécula de ADN circular cerrada, intermediaria en paso siguiente de transferencia conjugativa. Durante la etapa de conjugación, el donante y el receptor entran en contacto estrecho y una única hebra de ADN del ICE es transferida al nuevo hospedador mediante un mecanismo de replicación de círculo rodante. Luego de la transferencia, la ADN polimerasa de la célula receptora sintetiza la hebra complementaria dando como resultado la forma circular bicatenaria, que se integrará al cromosoma de su nuevo hospedador mediante recombinación sitio específica (Botelho J, et al., 2021) (Fig. 8A). La mayoría de los ICEs poseen un único lugar de inserción en el cromosoma de sus microorganismos hospedadores, a menudo cercano a genes que codifican para proteínas hipotéticas, y con menor frecuencia en el extremo 5' o 3' de algún gen codificante para un ARNt (Cury J, et al., 2017). Por el contrario, otros ICEs que codifican para una tirosina-recombinasa de baja especificidad de integración (p.ej. ICECp1) pueden insertarse en plásmidos conjugativos (Han X, et al., 2015).

Los ICEs presentan una estructura modular en donde genes y secuencias involucradas en una misma función se agrupan; dichos módulos suelen ser de integración/escisión, de conjugación, y un módulo de funciones accesorias. En función de la cantidad de genes presentes en este último módulo, los ICEs pueden variar en su tamaño, desde unos 11 Kb hasta 674 Kb (Bellanger X, et al., 2014) (Figs. 8B y 8C). Así, los ICEs pueden conferir a las bacterias propiedades como mayor virulencia, formación de *biofilms*, resistencia a metales pesados y resistencia a antibióticos o incluso la capacidad de usar compuestos tóxicos como fuente de carbono (Lei CW, et al., 2016). Más importante aún, la mayoría de los ICEs tienen un amplio rango de hospedadores y por lo tanto pueden transferir horizontalmente su carga genética entre grupos de especies disímiles, aunque los factores que determinan el rango de hospedadores no han sido completamente dilucidados (Delavat F, et al., 2017).

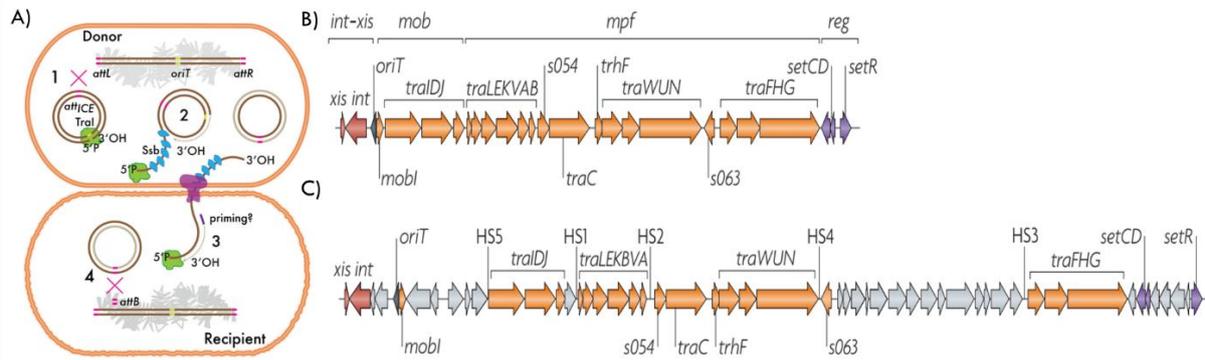


Figura 8A) Modelo generalizado de la transferencia de ICEs. El ICE integrado al cromosoma (barras marrones) puede escindirse mediante recombinación sitio específica (cruz roja) entre los sitios *attL* y *attR*, mediada por la integrasa del ICE. El ICE escindido sufre un corte de cadena única en el origen de transferencia, se “desenrolla” y es reconstituido por un mecanismo de círculo rodante; luego una copia de cadena única estabilizada por proteínas de unión a ADN (Ssb) atraviesa el canal conjugativo de tipo IV a una nueva célula receptora adonde se sintetiza la hebra complementaria y el ICE se recombina con el sitio *attB* del hospedador para volver a integrarse. Figura 8B) Estructura modular de un ICE básico; *int-xis*: módulo de integración y escisión; *mob*: módulo de movilización de ADN; *mpf*: módulo de formación de apareamiento bacteriano; *reg*: módulo de regulación. Figura 8C) ICE perteneciente a la familia SXT-R391 mostrando los 5 puntos calientes para la inserción de ADN de estos elementos genéticos móviles (HS1-HS5). Los genes en naranja participan en el proceso de conjugación, los genes en púrpura participan en la regulación, los genes en rojo participan en la integración y escisión, y los genes en gris presentan funciones accesorias o desconocida. Imagen adaptada de Delavat F, et al., 2017 y Wozniak RA, et al., 2010.

Con relación a *Salmonella*, un claro ejemplo de lo anterior está dado por la Isla Genómica 1 (SGI1), un elemento cromosómico móvil (~43 Kb) que porta un integrón y genes que confieren resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin y tetraciclina, entre otros. Inicialmente descrita en *S. Typhimurium* DT104, la SGI1 ha sido detectada en *S. Typhimurium* y otros serovares dentro de dicha especie, así como en *Proteus mirabilis* y *Morganella morganii*, entre otras especies de microorganismos Gram negativos (Cummins ML, et al., 2020). Hasta la fecha se han descrito más de 30 regiones de multiresistencia, así como variaciones genéticas en el esqueleto de SGI1 como producto de rearrreglos mediados por secuencias de inserción y por la acción del integrón complejo de clase 1, In104, presente en dicha isla (Schultz E, et al., 2017).

Si bien SGI1 carece de genes funcionales que puedan mediar en su diseminación, dichos genes pueden ser provistos por plásmidos conjugativos de tipo IncC; hasta la fecha parecen ser los únicos plásmidos con capacidad demostrada de movilizar SGI1 hacia distintos

hospedadores (Carraro N, et al., 2015; Carraro N et al., 2017). En ausencia de un plásmido IncC en una bacteria portadora de SGI1, la expresión constitutiva de la integrasa de SGI1 mantiene dicha isla integrada al cromosoma bacteriano. Por el contrario, el complejo activador AcaCD presente en plásmidos IncC, promueve la escisión de SGI1 y su movilización conjugativa en *trans* (Huguet KT, et al., 2016).

4.5. Regulación de la Transferencia Horizontal de Genes

Si bien los genomas bacterianos se mantienen estables de generación en generación, estos pueden verse modificados por THG, rearrreglos genómicos y por la actividad de elementos genéticos móviles. Las bacterias deben mantener un correcto balance entre integridad genómica y la inestabilidad, muchas veces necesaria para la adaptación a cambios en su entorno. Algunos sistemas que pueden controlar la estabilidad de los elementos genéticos móviles son: muerte post-segregacional (sistemas de restricción-modificación y sistemas toxina-antitoxina) y el sistema CRISPR/Cas (Darmon E, et al., 2014)

4.5.1. Sistemas de Restricción-Modificación

Los sistemas de restricción-modificación (R-M) son uno de los mecanismos bacterianos de defensa más conocidos y ampliamente distribuidos. Codifican para una metiltransferasa (MTasa) y para una endonucleasa de restricción (REasa) (Olivera RH, et al., 2016). Esta última reconoce y corta ADN exógeno en sitios específicos, mientras que la primera asegura la discriminación entre ADN propio e impropio mediante la transferencia de grupos metilo en secuencias específicas del ADN del genoma hospedador (Fig. 9).

Los sistemas R-M pueden clasificarse, a grandes rasgos, en cuatro clases distintas en función de la composición de las subunidades, el reconocimiento de secuencias, el sitio de corte, necesidad de cofactores y la especificidad de sustrato (De Ste Croix M, et al., 2017):

- Tipo I: complejo proteico hetero-oligomérico que abarca tanto la actividad de restricción como la de modificación. Estas enzimas se unen a secuencias bipartitas de ADN e introducen los cortes entre ~100 pb a miles de pares de bases del sitio blanco (De Ste Croix M, et al., 2017).
- Tipo II: presentan enzimas REasa y MTasa separadas; por lo general las REasas son homodiméricas u homotetraméricas e introducen cortes dentro o próximo al sitio blanco. Por otra parte, son las más ampliamente estudiadas y las de mayor uso en ensayos de biología molecular (Shaw LP, et al., 2023).
- Tipo III: las enzimas de tipo III son heterotrímeros (M_2R_1) o heterotetrámeros (M_2R_2) con actividad de restricción, de metilación y de NTPasa ADN-dependiente (Rao DN, et al., 2014).
- Tipo IV: los sistemas de tipo IV clivan únicamente secuencias específicas de ADN con bases metiladas, hidroximetiladas o gucosil-hidroximetiladas con baja selectividad de secuencias (Loenen WA, et al., 2014).

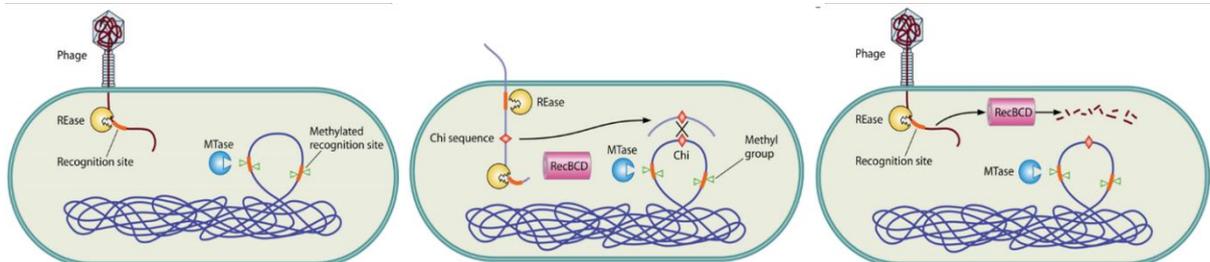


Figura 9. Sistemas de restricción-modificación (R-M). Estos sistemas reconocen el estado de metilación de ADN exógeno (fagos, plásmidos, etc.). Las secuencias metiladas son reconocidas como propias mientras que secuencias de reconocimiento en ADN exógeno, carentes de metilación son reconocidas como ajenas y son clivadas por una endonucleasa de restricción (imagen a la izquierda). El estado de metilación del ADN genómico es mantenido por las metiltransferasas del sistema R-M. La restricción de ADN exógeno de bacterias cercanamente emparentadas, con secuencias chi similares, genera fragmentos de ADN que pueden ser incorporados mediante recombinación homóloga por la vía RecBCD (imagen del centro); por el contrario, fragmentos generados por la restricción de ADN carentes de secuencias chi (p.ej. fagos) son reconocidos como impropios y son consecuentemente degradados a través de la vía RecBCD. Imagen adaptada de Vasu K, et al., 2013.

Además de estos grupos existen genomas que pueden presentar MTasas no asociadas a REasas, y reciben el nombre de “MTasas huérfanas”, así como también existen REasas no asociadas a MTasas (Vasu K, et al., 2013).

4.5.2. Sistemas Toxina-Antitoxina, o de Adicción

Los sistemas toxina-antitoxina (TA) son un conjunto de elementos genéticos presentes tanto en plásmidos como en el cromosoma de las bacterias. Todos ellos codifican para una toxina capaz de interferir con procesos bacterianos como la transcripción, la traducción, replicación del ADN y homeostasis de la membrana; la antitoxina por su parte inhibe todos estos efectos durante periodos de bajo estrés celular. Si bien inicialmente los sistemas TA fueron descritos como factores de suicidio celular, actualmente son considerados como sistemas de respuestas a estrés, resistencia a fagos, estabilidad plasmídica, regulación génica, formación de *biofilms*, muerte celular programada y formación de células persistentes (Hall AM, et al., 2017; Srivastava A, et al., 2021).

Los sistemas TA se encuentran ampliamente distribuidos entre los procariotas (Pizzolato-Cesar LR, et al., 2023). Específicamente, los de tipo I y II están presentes en distintas especies bacterianas, no existiendo una correlación con sus hábitats o con el tamaño de sus genomas; los sistemas de tipo III parecen ser más comunes en Fusobacterias y Firmicutes, encontrándose con menor frecuencia en Proteobacterias (Mruk I, et al., 2014). En función de la naturaleza y del efecto inhibitorio ejercido por la antitoxina, los sistemas TA pueden clasificarse en ocho distintos tipos (Qiu J, et al., 2022) (Fig. 10):

- a) Las de tipo I poseen un ARN antisentido que se hibrida con el ARNm de la toxina.
- b) Las de tipo II tienen una antitoxina proteica, que al adherirse directamente a la toxina neutraliza su efecto (Fozo EM, et al., 2010).
- c) Las de tipo III poseen un ARN antitoxina (que no es antisentido) el cual interactúa directamente con la proteína tóxica (Blower TR, et al., 2012).
- d) Las de tipo IV poseen una toxina y una antitoxina proteica, en donde ésta última interfiere en la unión de la toxina con su sitio blanco (Dy RL, et al., 2014).
- e) Las de tipo V tienen una antitoxina proteica, la cual corta el ARNm de la toxina (Wang X, et al., 2012).

- f) Las de tipo VI están compuestas por una toxina y una antitoxina de naturaleza proteica; la toxina inhibe la replicación del ADN adhiriéndose a la ADN polimerasa, mientras que la antitoxina promueve la degradación de la toxina (Aakre CD, et al., 2013).
- g) Las de tipo VII, tanto la toxina como la antitoxina son de naturaleza proteica; la antitoxina es una enzima que neutraliza la toxina mediante modificación postraduccional.
- h) En las de tipo VIII, ambos componentes son moléculas de ARN; estos pueden formar un dúplex que induce la degradación de la toxina, o formar un complejo con el complejo CASCADE (CRISPR-associated complex for antiviral defense) y conducir a la represión de la transcripción de la toxina (Qiu J, et al., 2022).

Los sistemas TA de tipo I y II son responsables del fenómeno de muerte post-segregacional o adicción (Rocker A, et al., 2016). Todos los sistemas TA examinados hasta el momento funcionan en base a diferencias en la estabilidad de la toxina y del antídoto (Równicki M, et al., 2020). Así, en sistemas TA de tipo II la diferencia de estabilidad entre la toxina y la antitoxina resultan en la susceptibilidad de la última a proteasas de tipo Lon, ClpPX o ClpPA (Mruk I, et al., 2014). Dicha susceptibilidad a las proteasas sería producto de una combinación de baja estabilidad termodinámica y de dominios sin plegar (Singh G et al., 2021). En la mayoría de los sistemas TA de tipo II, la toxina bloquea la traducción; otras afectan la replicación del ADN bloqueando la actividad de las girasas. Las recientemente descritas toxinas de tipo VII y VIII también actuarían bloqueando la traducción mediante interferencia con distritos ARNt (Jurènas D, et al., 2022). Por otra parte, la mayoría de las toxinas de los sistemas TA de tipo I y V actúan a nivel de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de ATP mediante una reducción de la fuerza motriz protónica, afectando en última instancia la síntesis proteica; de manera interesante, se ha visto que algunas de las toxinas pertenecientes a estos grupos son capaces de detener la división celular induciendo la condensación del nucleoide (Jurènas D, et al., 2022).

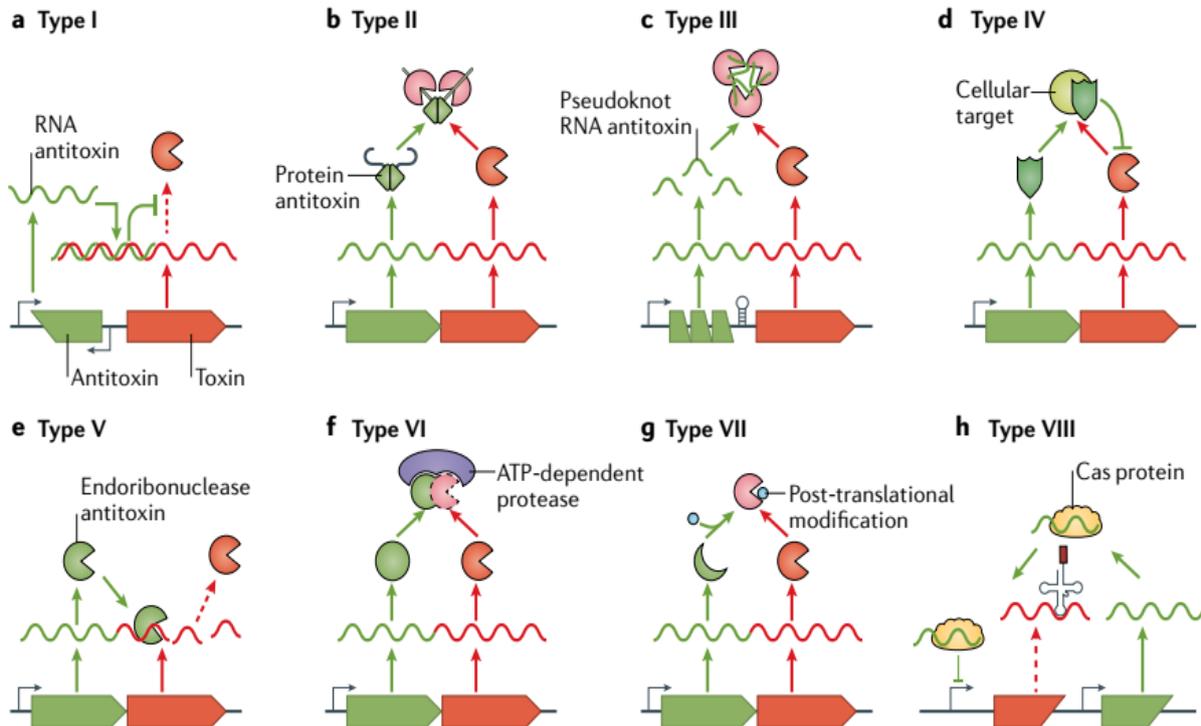


Figura 10. Esquema del modo de acción de los distintos tipos de sistemas toxina-antitoxina. Las toxinas están representadas en naranja y las antitoxinas en verde. En los sistemas de tipo I las toxinas despolarizan la membrana celular de las bacterias e interrumpen la síntesis de ATP: En los sistemas de tipo II, las toxinas inhiben el crecimiento bacteriano ya sea bloqueando la traducción o la replicación. En los sistemas de tipo III, las toxinas inhiben el crecimiento bacteriano al bloquear la transcripción. En los sistemas de tipo IV, las toxinas desestabilizan los filamentos bacterianos bloqueando la división celular. En los sistemas de tipo V, las toxinas lisan la membrana celular. En los sistemas de tipo VI, las toxinas se unen a la horquilla deslizante de la ADN polimerasa y bloquean la replicación del ADN. Los sistemas de tipo VII codifican para antitoxinas que inactivan las toxinas por modificación postraduccional. En los sistemas de tipo VIII los ARN antitoxinas participan en la represión transcripcional de la expresión del ARN toxina. Imagen tomada de Jurénas D, et al., 2022.

4.5.3. Silenciamiento Génico Mediante H-NS

A pesar de la relevancia en la adaptación bacteriana a nuevos ambientes o a cambios en su entorno, cualquier evento de THG tiene mayor posibilidad de traer aparejado una disminución en el *fitness* bacteriano que chances de mejorarlo. La introducción de un gen determinado mediante THG, independientemente de su potencial beneficio para la célula receptora, puede interrumpir vías regulatorias o drenar recursos metabólicos originalmente destinados a la producción de energía o de biomasa, si no está correctamente regulado (Ali SS, et al., 2014). H-NS es una proteína asociada al nucleóide, ampliamente estudiada; la misma se encuentra presente en gran cantidad de copias por célula bacteriana y se une al ADN, particularmente

en regiones con alto contenido A+T, como, por ejemplo, los genes adquiridos por transferencia horizontal (Dorman CJ, 2014; Hüttener M, et al., 2015). Al menos para *E. coli* se han encontrado sitios de unión de alta afinidad para H-NS, localizados primariamente en el surco menor de la molécula de ADN. Una vez unidos a estos sitios, H-NS se oligomeriza hacia regiones con menor afinidad formando grandes H-NS:ADN, dando lugar a dos posibles estructuras: a) puentes de H-NS formados por dos regiones de ADN unidas a través de dicha nucleoproteína, y b) filamentos de nucleoproteínas formados cuando H-NS cubre tramos contiguos de ADN (Picker MA, et al., 2016) (Fig. 11).

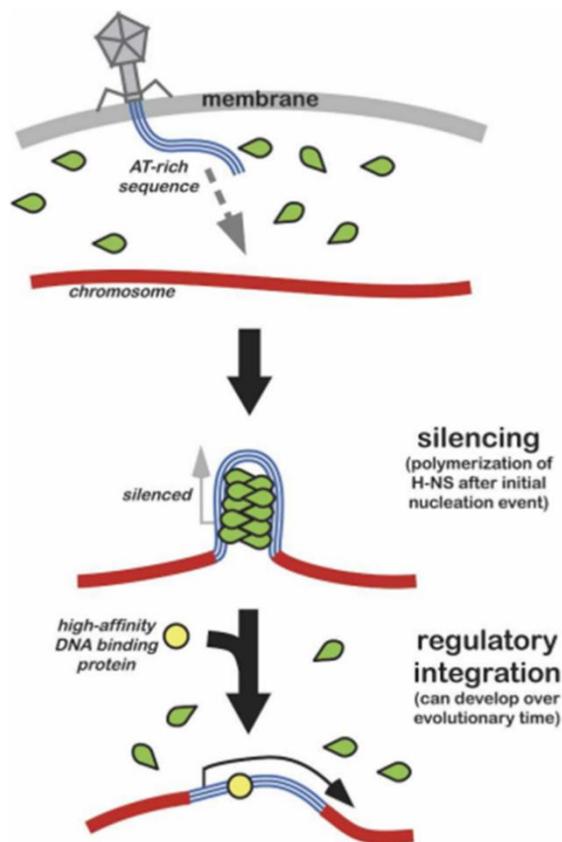


Figura 11. Mecanismo de facilitación de adquisición de ADN exógeno a través de silenciamiento xenogénico por proteínas H-NS. La unión y polimerización de H-NS (verde) a ADN exógeno rico en A+T lleva a silenciar la expresión de dicho ADN. Posteriormente, proteínas de unión a ADN específicas de secuencia (círculo amarillo), con mayor afinidad competirán con H-NS para aliviar el silenciamiento y permitir la expresión de genes bajo condiciones propicias. De este modo, el silenciamiento xenogénico le permite a la célula hospedadora tolerar la presencia de ADN extraño y finalmente “reclutar” y aprovecharse de ese ADN acoplándolo a una red regulatoria preexistente. Imagen tomada de Navarre WW, et al., 2007.

La evidencia experimental muestra que las proteínas H-NS y la ARN polimerasa raramente están co-localizadas durante la fase de crecimiento exponencial, lo que sugiere que la H-NS bloquearía el proceso de transcripción al interferir en la unión de la ARN polimerasa al ADN (Wang B, et al., 2022). En este sentido, las proteínas H-NS le confieren una ventaja evolutiva a *Salmonella* mediante el silenciamiento de ADN exógeno al reconocer secuencias que exhiben un contenido GC significativamente menor al del genoma hospedador (Groisman EA,

et al., 2023). Esta capacidad de las bacterias de aprovechar su proporción GC/AT característica para el reconocimiento de ADN exógeno ha sido denominada “silenciamiento xenogénico”, y se ha propuesto como un mecanismo de “tolerancia” ya que facilitaría la adquisición de secuencias ricas en A+T a lo largo del tiempo (Navarre WW, et al., 2007).

4.5.4. Sistemas CRISPR/Cas

Otro actor en la regulación de la adquisición de ADN exógeno son los sistemas CRISPR/Cas (**Cluster, Regularly Interspaced, Shorts, Palindromic Repeats / CRISPR-ASsociated**). Estos sistemas actúan como un elemento de defensa adaptativo contra material genético extraño proveniente de fagos o plásmidos (Burmistrz M, et al., 2015). En base a estudios filogenéticos de *loci* CRISPR y de genes *cas* se definieron tres clases de sistemas CRISPR, que pueden subdividirse en al menos 12 subtipos (Tipo IA-F, Tipo IIA-C y Tipo IIIA-C) (Van Erp PB, et al., 2015). Sin embargo, en base a estudios genómicos se ha elaborado un nuevo y más amplio esquema de clasificación; el mismo consta de dos clases de CRISPR/Cas, divididos en cinco tipos y 16 subtipos. De este modo, los sistemas CRISPR/Cas de clase 1 poseen complejos de efectores ARNcr formados por múltiples subunidades, mientras que en aquellos sistemas de clase 2 todas las funciones del complejo efector son llevadas a cabo por una única proteína, como p.ej.: Cas9. Asimismo, los tipos y subtipos se definen según las distintas configuraciones de los módulos de expresión, interferencia y adaptación (Makarova KS, et al., 2015).

Cada sistema consta de un arreglo CRISPR (ARNcr) formado por secuencias espaciadoras (21-27 pb), usualmente derivadas de elementos genéticos móviles como fagos y plásmidos, flanqueadas por secuencias repetitivas cortas (23-47 pb) que pueden o no ser palindrómicas; además constan de proteínas Cas codificadas adyacentes al arreglo ARNcr. Asimismo, los sistemas CRISPR suelen estar precedidos por una secuencia no codificante rica en A+T (o secuencia líder), que presuntamente actuaría como promotor de la transcripción del arreglo ARNcr (Nuñez JK et al., 2016). A medida que el ARNcr se transcribe, una pequeña molécula trans-activadora de ARN CRISPR (ARNtracr) se hibrida con las secuencias repetidas, dando

lugar a una estructura de ARN bicatenario; este complejo es reconocido y cortado por la ARNasa III generando numerosos y pequeños ARNcr de identificación. Luego el ARNtracr y los ARNcr individuales se asocian con Cas, y cuando se da el apareamiento entre el ARNcr y su blanco complementario, o protoespaciador (~30 pb y 100% identidad nucleotídica), los dominios endonucleasa de Cas introducen cortes en el ADN blanco (Sampson TR, et al., 2014) (Fig. 12).

Por otra parte, se ha demostrado que las proteínas H-NS están involucradas en la integración de sistemas CRISPR/Cas a la red regulatoria de *E. coli*, más específicamente, suprimiendo la expresión de dichos sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. Una posible explicación detrás de esta regulación en menos sería evitar que las proteínas Cas integren erróneamente material genético de la célula hospedadora como espaciadores (Zakrzewska M, et al., 2023). Del mismo modo, en algunos sistemas CRISPR/Cas la presencia de motivos adyacentes a los protoespaciadores (PAMs) en las secuencias blanco contribuyen a la discriminación de moléculas diana de ADN en propias o impropias (Zakrzewska M, et al., 2023).

El género *Salmonella* posee un sistema CRISPR/Cas de tipo I-E, y presenta a su vez dos *loci* CRISPR (CRISPR1 y CRISPR2) separados por aproximadamente 16 Kb; dichos loci difieren en la identidad y en el número de espaciadores y de repetidos (Shariat N, et al., 2015).

Además, existe evidencia de variación significativa en el largo de los arreglos CRISPR y en la presencia/ausencia de genes *cas* entre los distintos serovares de *Salmonella*; del mismo modo, estudios filogenéticos han demostrado la presencia de dos perfiles distintos de genes

cas en dicho género, lo que sugiere la ocurrencia de eventos de transmisión horizontal (Kushwaha SK, et al., 2020).

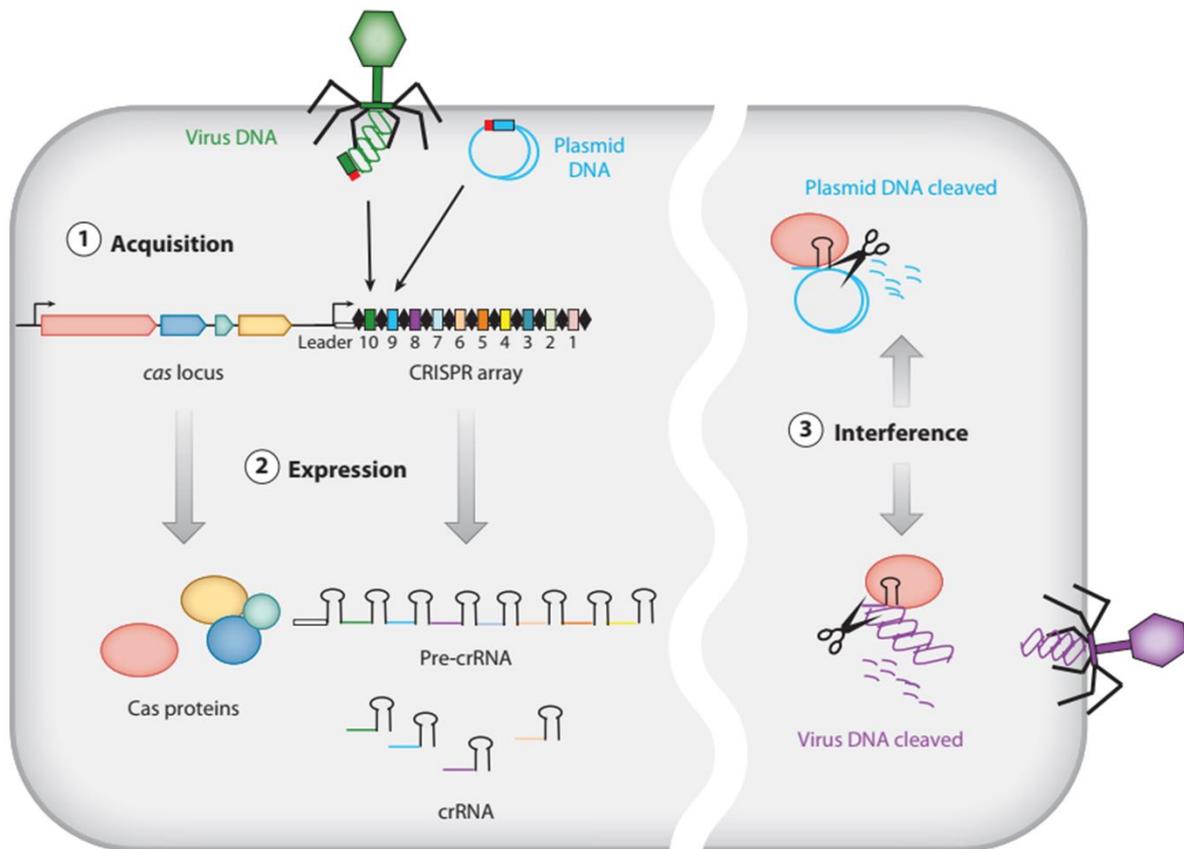


Figura 12. Esquema del mecanismo de acción de sistemas CRISPR/Cas. Durante la adquisición de espaciadores CRISPR (1), fragmentos específicos de ADNbc de fagos o plásmidos (con motivos asociados a protoespaciadores adyacentes, barra roja) son incorporados en el extremo líder del arreglo CRISPR en el cromosoma de la bacteria hospedadora. Dicho arreglo consiste en espaciadores (rectángulos coloreados numerados; a mayor número, más reciente la incorporación) separados por secuencias repetidas (óvalos negros). En la siguiente etapa (2), se da la transcripción del ARN pre-CRISPR (Pre-crRNA) a partir de la región líder, y luego el transcripto es cortado por proteínas CAS en pequeños ARNcr que presentan un espaciador y un repetido parcial (horquillas con espaciadores coloreados). Durante la etapa de interferencia por CRISPR (3), aquellos ARNcr con espaciadores que presentan una elevada identidad con el ADN exógeno, iniciarán un evento de clivaje. Este proceso interfiere con la replicación viral o la actividad plasmídica confiriendo así inmunidad al hospedador. Por otra parte, esta tercera etapa puede estar separada tanto mecánicamente como temporalmente de las etapas de adquisición y de transcripción. Imagen tomada de Bhaya D, et al., 2011.

Por otra parte, Liu y colaboradores diseñaron un esquema de subtipificación para *Salmonella* basado en las secuencias de los genes de virulencia *fimH* y *sseL* y de los loci CRISPR (designado CRISPR-MVLST); dicho esquema mostró un mayor poder de discriminación que la electroforesis en campo pulsado para el estudio de brotes por los serovares más

prevalentes de *S. enterica* (Liu F, et al., 2011; Shariat N, et al., 2013). Empleando dicha metodología se investigó también el nexo entre la resistencia a los antimicrobianos en *S. Typhimurium* y el secuenciotipo de sistemas CRISPR; los resultados de dicho estudio mostraron la existencia de diferencias significativas en las frecuencias y los perfiles de resistencia entre los distintos secuenciotipos, tanto en aislamientos de origen humano como de origen veterinario (Di Marzio M, et al., 2013).

5. HIPÓTESIS

Como se mencionó anteriormente, SNT constituye la causa bacteriana más frecuente de intoxicación alimentaria en el Uruguay y uno de los principales obstáculos para el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos está dado por la resistencia a los antimicrobianos. En tal sentido, es desconocida la dinámica evolutiva responsable de la adquisición e intercambio de fenotipos de resistencia y virulencia entre las cepas de *S. enterica* en nuestro país.

En virtud de lo anteriormente expresado, esta tesis parte de la hipótesis de que los distintos elementos genéticos móviles han jugado un papel clave en la incorporación y acumulación progresiva de genes de resistencia a los antibióticos, en aislamientos de *S. enterica* en Uruguay.

5.1. OBJETIVOS

5.1.1. Objetivo General

Caracterizar genéticamente una colección de aislamientos uruguayos de *S. enterica* recolectados durante cinco décadas, con el fin de profundizar en la comprensión de la dinámica de la resistencia a los antibióticos en esta especie.

5.1.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la presencia de genes de resistencia en genomas de aislamientos de *S. enterica* pertenecientes a la colección de la Unidad Académica de Bacteriología y Virología, y caracterizar sus entornos genéticos y posibles vías regulatorias.
2. Caracterizar mediante análisis de secuencias los plásmidos de resistencia presentes en los aislamientos estudiados.
3. Estudiar la filogenia de los plásmidos de resistencia.

4. Estudiar la presencia de genes asociados a virulencia en los genomas de *S. enterica*.
5. Estudiar la presencia de genes relacionados a sistemas de defensa bacterianos en los genomas de *S. enterica*.
6. Determinar si existe alguna correlación entre los resultados *in silico* del resistoma y el fenotipo de resistencia.
7. Determinar si existen asociaciones entre el contenido de genes RAM, genes de virulencia, sistemas de defensa y grupos de incompatibilidad plasmídica
8. Contrastar los datos de resistencia antibiótica de las cepas analizadas, en un contexto regional a través de estudios de genómica comparativa usando información disponible en bases de datos públicas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas

Se estudiaron los genomas de 212 cepas de *Salmonella enterica* de origen humano, animal y de alimentos, pertenecientes a la colección de la Unidad Académica de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene. La mayoría fueron secuenciadas en el marco de un proyecto de colaboración científica con el Wellcome Trust del Instituto Sanger (Reino Unido); dichas cepas fueron elegidas intentando abarcar diversos serovares, asociados a infección en el ser humano y/o en animales, y cubriendo un periodo de tiempo comprendido entre los años 1976 y 2013. Asimismo, se incluyeron los siguientes aislamientos de *Salmonella enterica*, que fueron remitidos a nuestra Unidad Académica: cinco aislamientos que habían sido previamente caracterizados como resistentes a CTG obtenidos entre los años 2011 y 2013, a partir de coprocultivos y de un urocultivo. Por otro lado, se incluyeron dos aislamientos más recientes, uno obtenido en el año 2016 y el otro en el año 2022, el primero resistente a CTG y el segundo resistente a carbapenems. Ambos aislamientos fueron obtenidos de muestras clínicas de origen humano; el primero se asoció a un cuadro de gastroenteritis en un paciente pediátrico, mientras que el segundo provino de un urocultivo de un paciente adulto que previamente había desarrollado estando internado, un cuadro de gastroenteritis con bacteriemia.

6.2. Procesamiento de la Muestras y Conservación.

Se realizaron estudios fenotípicos de susceptibilidad antibiótica a partir del reaislamiento de microorganismos almacenados en stocks criopreservados (-80°C). Con un asa bacteriológica estéril se raspó la superficie de dichos stocks y se sembró en agar Luria Bertani (LB); luego de su incubación a 37°C durante 24 hrs se verificó que el crecimiento fuese monomicrobiano y compatible con la morfología colonial de *Salmonella enterica*; posteriormente, se confirmó la identidad de los reaislamientos mediante desorción/ionización láser asistida por matriz

(MALDI-TOF) (Bruker, MA). La serotipificación fue realizada en el Centro Nacional de *Salmonella* (Unidad Académica de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene) usando sueros polivalentes y monovalentes (Difco, Detroit, MI; Bio-rad Laboratories, Hercules, CA). Por otra parte, para la conservación de los aislamientos clínicos recibidos en nuestro laboratorio, en primer lugar, los mismos fueron crecidos ON a 37°C, en agitación (200 rpm) en caldo LB suplementado con ceftriaxona (1 µg/mL) o ceftazidima (2 µg/mL). Posteriormente, alícuotas de dichos cultivos fueron almacenadas con glicerol 30% (v/v) a una temperatura de -80°C.

6.3. Estudios de Susceptibilidad Antibiótica.

La susceptibilidad antibiótica de las cepas analizadas en el presente trabajo se determinó usando el método de disco difusión en agar de Kirby-Bauer, siguiendo las normas de la Clinical and Laboratory Standards Institute 2023 (CLSI). Los antibiogramas fueron incubados a 37°C durante 20 hs, empleando la cepa de *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 como control de calidad. Los resultados fueron interpretados de acuerdo con los lineamientos de la CLSI. Por otra parte, la presencia de β-lactamasas de espectro extendido o de metalo-β-lactamasas se evidenció mediante un test de sinergia de doble disco usando combinaciones de discos de ceftazidima (CAZ) -amoxicilina /ácido clavulánico (AMC) - ceftriaxona (CRO) y de Imipenem (IMP) -EDTA – Meropenem (MEM), respectivamente (Papa-Ezdra R, et al. 2021).

6.3.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima a Fosfomicina.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a fosfomicina de aquellas muestras que presentaban en su genoma el gen de resistencia a *fosA7*, mediante el método de dilución en agar recomendado por la CLSI. Brevemente, en primer lugar, se prepararon placas de agar Mueller-Hinton suplementadas con glucosa-6-fosfato (25 µg/mL) con 12 concentraciones seriadas de fosfomicina disódica [rango 0,25 – 512 µg/mL]. Luego a partir

de cultivos ON en agar LB se prepararon en suero fisiológico suspensiones bacterianas con una turbidez 0,5 en la escala McFarland; diluciones 1/20 de dichas suspensiones fueron cargadas en un multi inoculador de Steers para la determinación de la CIM. Como control interno se incluyó la cepa ATCC *E. coli* 25922. Cada concentración fue ensayada por duplicado, y luego de una incubación ON a 37°C los resultados fueron interpretados siguiendo las normas de la CLSI, tomando los puntos de corte para aislamientos de *E. coli* de origen urinario (CLSI, 2023).

6.3.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima a Colistina.

La CIM a colistina se determinó mediante el método de dilución en agar sugerido por la CLSI. Para ello se sembraron, en forma de estría, 10 µL de diluciones 1/10 de inóculos bacterianos con una turbidez equivalente a 0,5 en la escala McFarland, en placas de agar Mueller Hinton conteniendo 0, 1, 2 y 4 µg/mL de colistina. Se agregó también al estudio la cepa ATCC *P. aeruginosa* 27853 como control. Luego de una incubación ON a 37°C, se examinaron las distintas placas en busca de colonias o la presencia de una ligera película de crecimiento. Los resultados del ensayo fueron interpretados de acuerdo con las normas de la CLSI (CLSI, 2023).

6.4.1. Extracción de ADN para Ensayos de PCR.

Los aislamientos bacterianos fueron cultivados ON a 37°C en agar LB. La extracción del ADN bacteriano se realizó mediante el método de shock térmico; brevemente, se resuspendieron 3 colonias por aislamiento en 150 µL de buffer TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0,1M). Las suspensiones bacterianas fueron primero incubadas durante 10 min. a 100°C e inmediatamente incubadas a 0°C durante 5 min. Posteriormente los extractos fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min. y se transfirieron los sobrenadantes a tubos de minicentrífuga nuevos y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

6.4.2. Extracción de ADN para Secuenciación Genómica (WGS).

Para los ensayos de WGS, las cepas a secuenciar fueron incubadas ON a 37°C en caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes (1 µg/mL CRO o 2 µg/mL CAZ). La extracción de ADN se llevó a cabo usando el kit comercial NZY microbial gDNA Isolation Kit (NZYTech Genes & Enzymes, Lisbon, Portugal), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN extraído fue determinada usando el NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA), evaluando los niveles de absorbancia a $\lambda=260/280$ nm y $\lambda=260/230$ nm; por otra parte, la cuantificación del ADN de cada extracción se realizó usando el fluorómetro Qubit® 3.0 y el kit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.5. Amplificación de Genes de Resistencia.

A los últimos dos aislamientos clínicos de *S. enterica* incluidos en la presente tesis se les realizó PCR en búsqueda de genes de resistencia basado en los respectivos perfiles de susceptibilidad/resistencia. Para el aislamiento con test de sinergia sugestivo de BLEE se realizó la búsqueda de *bla*_{CTX-M} grupos 1-4, *bla*_{CTX-M-25}, *bla*_{PER}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} (Lewis JS, et al., 2007; Lopes AC, et al., 2010; Vignoli R, et al., 2006) Por otra parte para el aislamiento con test de sinergia sugestivo de metalo-β-lactamasa se realizó la búsqueda por PCR del gen *bla*_{NDM-1} (Nordmann P, et al., 2011). Adicionalmente, se buscó la presencia de los siguientes genes transferibles de resistencia a quinolonas en estos aislamientos: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC* (Liao CH, et al., 2013; Cavaco LM, et al., 2009). Para la detección de la variante de gen *aac(6′)-Ib-cr*, en primer lugar, se realizó un ensayo de PCR para el gen *aac(6′)-Ib*, y luego un ensayo de restricción del producto de amplificación usando la enzima de restricción *BseGI* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Ma; USA). La mezcla de restricción se hizo siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se incubó a 55°C durante 3 hs. Los resultados fueron visualizados luego de electroforesis en agarosa 2% (p/v) y

posterior tinción con bromuro de etidio. La ausencia de sitios de restricción para la enzima *BseGI* fue interpretada como un resultado positivo para la variante *aac(6)-Ib-cr* (Cordeiro NF, et al., 2008).

6.6. Secuenciación Genómica.

Los aislamientos multirresistentes UY192, UY193, UY194, UY195, UY196, UY197 y UY198 fueron secuenciados *de novo* en la Unidad de Genómica de nuestro laboratorio. Por un lado, las librerías de ADN_g para la plataforma Illumina fueron preparadas usando el Nextera XT kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA); la secuenciación se llevó a cabo en un sistema Illumina MiniSeq usando un “cartucho” MiniSeq high-output reagent kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA); la estrategia empleada fue de secuenciación de ambas hebras, 151 ciclos de amplificación c/u (2 X 151 paired-end).

Por otra parte, las librerías para secuenciación por plataforma Nanopore fueron preparadas usando el Rapid Barcoding kit SQK-RBK004, siguiendo las instrucciones del fabricante; las librerías se cargaron en una celda R.9.4.1 y fueron secuenciadas durante 12 hs usando el secuenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). El *basecalling* de los archivos de salida de esta plataforma se hizo mediante los programas Guppy v6.5.7 y Dorado v0.7.2 (<https://community.nanoporetech.com>), empleando el modo de alta fidelidad.

6.7. Ensamblado Genómico *de novo*.

Previo al ensamblaje se cotejó la calidad de los *reads* obtenido mediante ambas plataformas de secuenciación usando los programas FastQC para Illumina (<https://BabrahamBioinformatics.com> - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data), y NanonPlot v1.33.1 para Nanopore (De Coster W, et al.; 2023). Posteriormente, los *reads* de Illumina fueron filtrados con el programa FastP v0.23.2 (Chen S, et al., 2018), mientras que

aquellos generados con la plataforma Nanopore fueron filtrados con el programa Filtlong v0.2.1 (<https://github.com/rrwick/Filtlong>), removiendo aquellos *reads* con un largo inferior a 1000 pb y un score de calidad <95. El ensamblado de novo, usando *reads* de lectura corta y larga, fue realizado con el programa Tricycler v0.5.3 (Wick RR, et al., 2021); para ello se dividió los *reads* de lectura larga en distintas submuestras que fueron preensambladas con los programas Flye v2.9-b1768, Canu v2.2, Raven v1.8.1 y Unicycler v0.5.0 (Kolmogorov M et al., 2019; Koren S, et al., 2017; Vaser R, et al., 2021; Wick RR, et al., 2017). Posteriormente los genomas ensamblados fueron “pulidos” primeramente con el programa Medaka v1.6.1 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>) y luego con el programa Polypolish v0.5.0 haciendo uso de los *reads* generados con la plataforma Illumina (Wick RR, et al., 2022).

6.8. Estudios Bioinformáticos.

El análisis de los genomas fue llevado a cabo utilizando diversas herramientas bioinformáticas que se detallan más abajo; dichas herramientas son de libre uso y fueron usadas desde la línea de comando o desde diversos sitios web.

6.8.1. Detección de Genes de Resistencia a Antibióticos.

A partir de los archivos fasta de los 212 aislamientos de *S. enterica* incluidos en la presente tesis, se realizó la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos. Para ello se usó el programa Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>), cargando la base de datos de Resfinder (Zankari E, et al., 2012), así como el programa AMRFinderPlus v3.11.18 de la NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Feldgarden M, et al., 2019); éste último programa fue utilizado en conjunción con el programa GNU Parallel para poder analizar todos los genomas simultáneamente (Tange O, 2011)

6.8.2. Búsqueda de Genes de Virulencia y Grupos de Incompatibilidad.

De manera similar al anterior apartado, se buscó la posible presencia de replicones plasmídicos, y los distintos genes de virulencia presentes en los distintos genomas de *S. enterica* incluidos en este trabajo empleando el programa Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>). En esta instancia se usaron las bases de datos de PlasmidFinder (Carattoli A, et al., 2014) y del VFDB (Virulence Finder Database) (Chen L, et al., 2016). En ambas instancias, y al igual que en el apartado 6.9.1, las búsquedas fueron llevadas a cabo con el criterio de cobertura e identidad mínimas igual a 70%.

6.8.3. Generación de *Heatmaps*.

A partir de los resultados obtenidos en los apartados 6.9.1 y 6.9.2 se generaron matrices de datos binarios mediante el modificador `--summary` del programa Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>). Dichas matrices fueron luego empleadas para generar sendos gráficos de presencia / ausencia (*heatmaps*) para genes de resistencia antibiótica, replicones plasmídicos y genes de virulencia. Dichos gráficos fueron creados usando el programa disponible en línea Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), agregando en cada caso la metadata correspondiente.

6.8.4. Predicción de Serotipos de *Salmonella*.

A partir de los genomas ensamblados se llevó a cabo la predicción *in silico* de los serovares de *Salmonella*. A tal fin se utilizó el programa Seqsero2 v1.3.1 (Zhang S, et al., 2019). Para aquellos casos en los cuales la predicción del serovar arrojó resultados no concluyentes, la identificación se completó con el servicio *online* JSpeciesWS (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>), empleando la búsqueda mediante tetra correlación (TCS). Los resultados fueron comparados con los obtenidos previamente mediante serotipificación tradicional, y se integraron a la metadata para su utilización en etapas subsiguientes del análisis.

6.8.5. Estudios de Evolución Neutra.

Se llevó a cabo la búsqueda de evidencia de evolución adaptativa actuando sobre genes de resistencia antibiótica en el genoma de los aislamientos de *S. enterica*. Para ello, en primer lugar, se procedió a crear una base de datos local a partir de los genomas de *Salmonella* incluidos en la presente tesis con el comando “makeblastdb” del programa BLAST+ (Camacho C, et al., 2009); luego se buscó en la base de datos generada la presencia de aquellos genes de resistencia a antibióticos que se encontraban presentes a lo largo de prolongados periodos de tiempo [≥ 8 años] (comando “blastn”). De este modo, para cada gen de resistencia buscado, se obtuvo una lista de genomas en los que estaban presentes, a partir de la cual se extrajeron las secuencias nucleotídicas, empleando para ello el comando “blastdbcmd” del programa BLAST+.

El ensayo estadístico de evolución neutral fue llevado a cabo con el programa MEGA-X (Kumar S, et al., 2018). Primeramente, a partir de las secuencias nucleotídicas extraídas se realizó un alineamiento basado en codones con el algoritmo MUSCLE, removiendo los *gaps* que estuviesen presentes. Luego se empleó, *in situ*, el test estadístico Z de selección, también basado en codones (Zhang J, et al., 1997) con los siguientes parámetros: a) sustituciones = sinónimas - no sinónimas; b) método de proporciones de Nei-Gojobori. En dicho test se ensayaron las hipótesis de “selección purificante” (eliminación de variantes no funcionales), “selección positiva” (selección de variantes más ventajosas) y de “selección neutra” (selección por deriva génica aleatoria); la estimación de la varianza se realizó mediante *Bootstrap* de 1000 réplicas, y se consideró un $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

6.8.6. Predicción y Extracción de Secuencias Plasmídicas.

Se procedió a la búsqueda de posibles secuencias plasmídicas en archivos multifasta de los aislamientos de *Salmonella*, para tratar de identificar qué genes de resistencia a los antibióticos se encontraban codificados en dichos elementos móviles. Para ello, en primer lugar, se generó una lista con el nombre de todos los archivos a procesar, y luego se ejecutó

el programa PlasClass para la predicción de las posibles secuencias plasmídicas (Pellow D, et al., 2020). Posteriormente se concatenaron todos los archivos de salida y se retuvieron aquellos nodos que mostraron un $p > 0.5$ y una longitud superior a 1000pb, luego se extrajeron las posibles secuencias plasmídicas corriendo la lista descrita arriba en el programa BLAST+ y finalmente dichos nodos fueron analizados en busca de genes de resistencia antibiótica y grupos de incompatibilidad con el programa Abricate (<https://github.com/tseemann/abricate>), usando las correspondientes bases de datos.

6.8.7. Análisis Comparativo de Plásmidos de Tipo Incl.

En virtud de encontrarse ampliamente representados en nuestra muestra y de su frecuente asociación a distintos genes RAM, se realizó un estudio comparativo de los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad Incl, que se encontraban presentes en los genomas de *Salmonella*. En primera instancia, las secuencias nucleotídicas de dichos plásmidos fueron anotadas mediante el servicio en línea RAST v2.0 [Rapid Annotation using Subsystems Technology] (Aziz RK, et al., 2008), y el curado de las anotaciones se realizó de forma manual con el programa Artemis v17.0.1 (Carver T, et al., 2012). El alineamiento y estudio de sintenia de los distintos plásmidos se hizo visualmente con los programas MAUVE (<https://darlinglab.org/mauve/mauve.html>) y EasyFig v2.1. (Sullivan MJ, et al., 2011). Posteriormente, se realizó el estudio de pangenoma y la identificación de posibles genes ortólogos en los distintos plásmidos Incl con el *pipeline* Prokka v.14.5 - Roary (Seemann T, 2014; Page AJ, et al., 2015); los gráficos obtenidos a partir del estudio de pangenoma fueron generados por el programa FastTree (Price MN, et al., 2009) y RStudio v.2021. La predicción del perfil de pMLST de los plásmidos en estudio se realizó a través del programa pMLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/pMLST/>). Para el análisis filogenético de los plásmidos Incl se extrajo y se empalmó las secuencias nucleotídicas de los genes tomados en cuenta para el esquema pMLST (*repl*, *ardA*, *trbA*, *sogS* y *pilL*). El alineamiento de secuencias y el dendrograma fueron llevados a cabo con el programa MEGA-X (Kumar S, et al., 2018); en tal sentido, la historia evolutiva de estos plásmidos fue inferida usando el método de Neighbour-

Joining, con un test de Bootstrap de 500 réplicas (Saitou N, et al., 1987); las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Máxima Similitud Compuesta tomando en cuenta el número de sustituciones nucleotídicas por sitio (Tamura K, et al., 2004).

6.8.8. Caracterización de los Aislamientos Secuenciados en Nuestra Unidad.

La predicción de genes de resistencia y plásmidos de los genomas secuenciados y ensamblados durante el transcurso de esta tesis se llevó a cabo con los programas AMRFinderPlus v3.11.18 (Feldgarden M, et al., 2021) y ABRicate v.1.01 (<https://github.com/tseemann/abricate>), respectivamente, usando para este último la base de datos de PlasmidFinder. Por otra parte, la determinación de los perfiles de MLST y pMLST se hizo mediante los programas en línea MLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) y pMLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/pMLST/>), respectivamente. La anotación de estos genomas se hizo a través de RAST 2.0 (Aziz, RK, et al., 2008); los plásmidos anotados fueron curados manualmente con el programa Artemis (Carver T, et al., 2012) y sus respectivos mapas físicos fueron generados con los programas Proksee Genome Analysis web tool (<https://proksee.ca/>) y EasyFig. 2.1 (Sullivan MJ, et al., 2011). El análisis filogenético de estos plásmidos se realizó de manera similar a lo descrito en la sección 6.9.7.

6.8.9. Predicción de Mecanismos de Defensa Bacteriana.

La búsqueda de sistemas R-M, sistemas de adicción, y sistemas CRISPR/Cas fue llevada a cabo a partir de los genomas ensamblados de todos los aislamientos de *S. enterica* incluidos en la presente tesis. Para ello, se concatenaron todos los archivos fasta en un único archivo de igual extensión, y luego dicho archivo fue analizado mediante el programa DefenseFinder v2.0.0, empleando los parámetros por defecto (Tesson F, et al., 2022; Néron B, et al., 2023; Couvin D, et al., 2018).

6.9. Análisis Estadísticos.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos fue realizado usando el paquete informático SPSS v23 para Windows (IBM© SPSS© Statistics) y el programa R v4.4.2 (<https://www.r->

project.org/). La búsqueda de correlación entre variables categóricas como serovar y origen de la muestra, y el número de genes de resistencia antibiótica, genes de virulencia y grupos de incompatibilidad plasmídica se llevó a cabo mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA); en función de la variabilidad del número de muestras por serovar y del número de muestras por origen, se aplicó el test *post-hoc* Games-Howell, ya que el mismo no asume igualdad de varianzas y ajusta los grados de libertad para las distintas comparaciones (Lee S, et al., 2018). Por otra parte, se analizó la existencia de una posible correlación entre variables numéricas como el número de genes de resistencia, el número de grupos de incompatibilidad, o el número de genes de virulencia, mediante un análisis bivariado de dos colas; en primer lugar, se comprobó la normalidad de las variables mediante los tests de Kolgomorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk, y luego se procedió a realizar el test de rangos de Spearman; asimismo, la búsqueda de posibles asociaciones entre sistemas de defensa bacterianos y los distintos serovares se llevó a cabo mediante un análisis de correspondencia usando el paquete FactoMineR (Lê S, et al., 2008), y empleando el paquete factoextra (Kassambara A, 2017) para visualizar los resultados. La comparación de porcentajes de resistencia antibiótica entre diferentes periodos se llevó a cabo mediante el test exacto de Fisher. Por otra parte, para el estudio de correlación entre el genotipo y el fenotipo de la resistencia antibiótica se llevó a cabo mediante el test kappa (κ) de Cohen (McHugh ML, 2012), determinando para cada categoría los valores de i) sensibilidad (capacidad de detectar la presencia el fenotipo de resistencia); ii) especificidad (capacidad de detectar los verdaderos fenotipos se susceptibilidad); iii) precisión (coincidencia entre los resultados de sensibilidad y de especificidad). Por otro lado, el análisis de correlación entre el número de genes de defensa bacterianos y genes RAM se hizo mediante el test de correlación de Spearman. En todos los análisis se tomó un $\alpha=0.05$ como nivel de significancia. Adicionalmente, se emplearon los programas EXCEL 365 (Microsoft® Office 365) y el paquete pheatmap v1.0.12 (<https://cran.r-project.org/package=pheatmap>) para la generación de las distintas gráficas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE ASPECTOS ESPECÍFICOS

7.1. Muestras Estudiadas.

Se analizó el genoma de 212 aislamientos de *Salmonella enterica* cuyas fechas de recolección van desde el año 1976 hasta el año 2022. De estos, 205 fueron secuenciados en el Wellcome Trust Sanger Institute (Reino Unido), mediante la plataforma Illumina; por otra parte, durante la presente tesis se secuenciaron en nuestra Unidad Académica otros 7 aislamientos mediante las plataformas Illumina y Nanopore.

Como se mencionó previamente, todos los aislamientos estudiados pertenecieron a la especie *S. enterica*, de los cuales los serovares mayoritarios fueron Enteritidis y Typhimurium (29.7% y 24.5%, respectivamente); otros serovares presentes en menor frecuencia fueron: Derby (13.7%), Gallinarum (9.9%), Dublín y Montevideo (6.6% c/u) (Fig. 13).

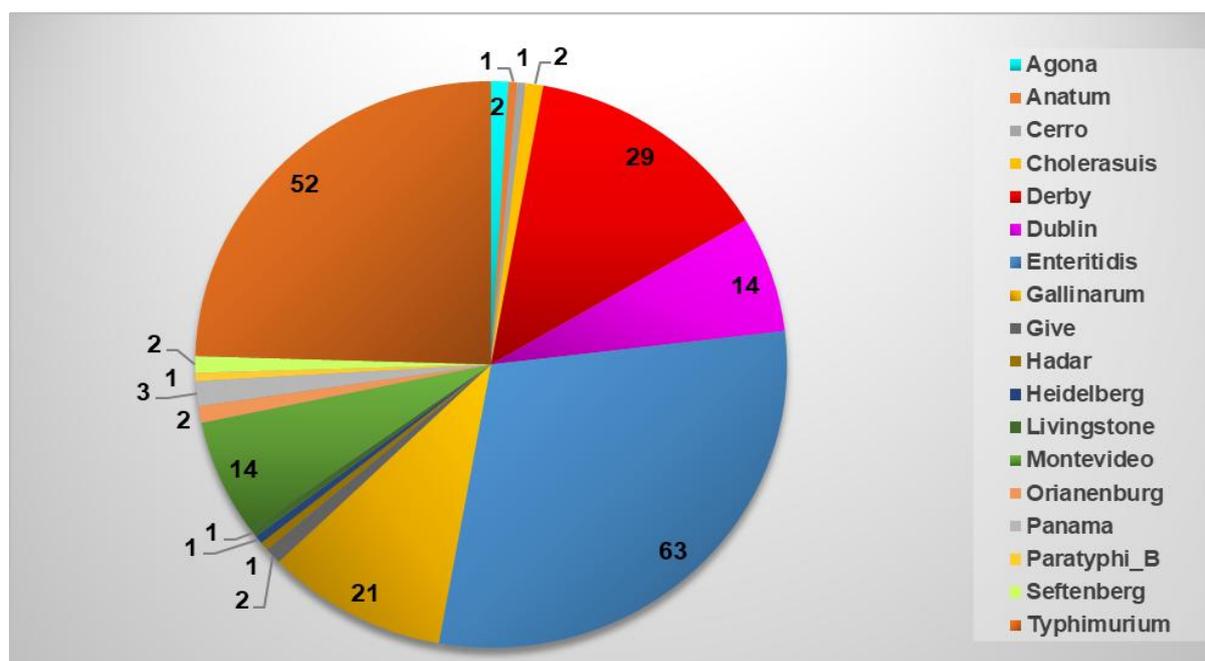


Figura 13. Distribución de los serovares de *Salmonella enterica* analizados en la presente tesis. Los valores están expresados como frecuencia (número de cada serovar/origen).

Por otra parte, con relación al origen de las muestras la mayoría de los aislamientos de *S. enterica* fueron obtenidos a partir de coprocultivos (36.8%), siendo otras fuentes importantes huevos (19.5%), hemocultivos y pollos (11% c/u) (Fig. 14).

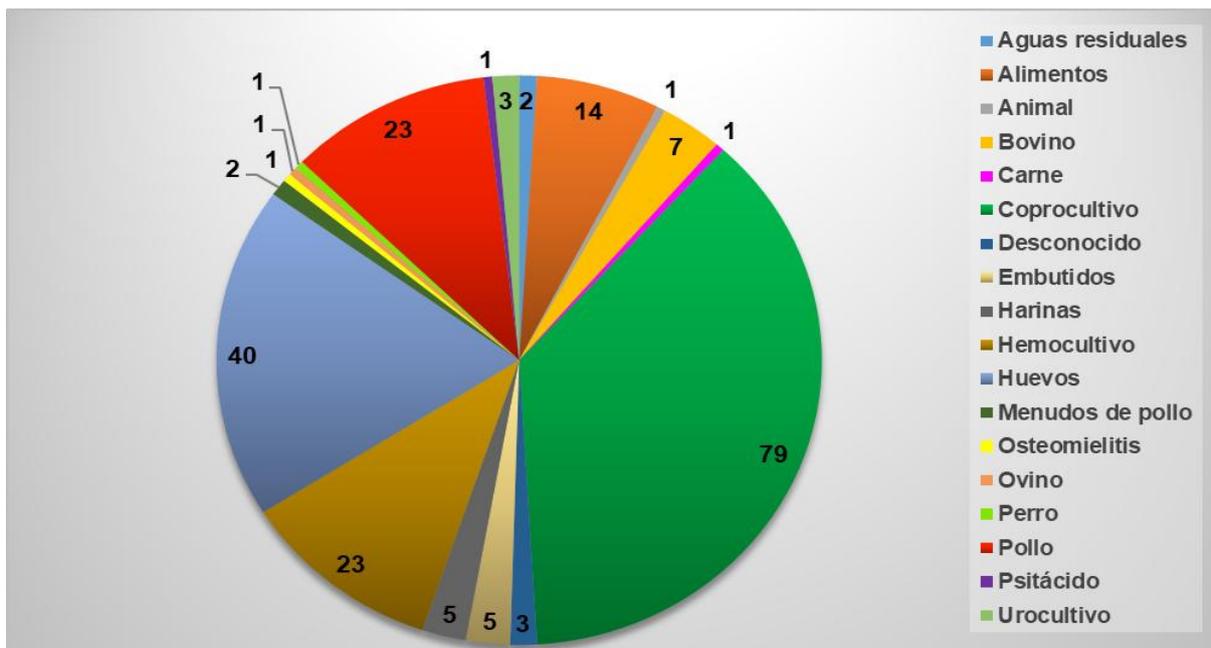


Figura 14. Distribución de las muestras de *S. enterica* según su origen. De manera similar a la figura anterior, los valores están expresados como frecuencia (número de cada serovar/origen).

7.2. Detección de Genes de Virulencia.

El estudio de predicción de genes de virulencia, a partir de las secuencias nucleotídicas, mostró que todos los genomas estudiados codificaban para un número variable de dichos genes. En tal sentido, la media de genes putativos de virulencia por genoma analizado fue de aproximadamente 194, con valores mínimos y máximos de 172 y 211 genes, respectivamente. La frecuencia de genes de virulencia parece seguir una distribución bimodal, en la cual la mayoría de los genomas estudiados presentan 201 (n=41) y 202 (n=32) de tales genes. La comparación de medias de genes de virulencia en función del serovar mostró la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre algunos de tales serovares; así, aquellos que presentaron una mayor media de genes de virulencia fueron Dublín y Typhimurium, mientras que el serovar Montevideo mostró la menor media de genes de virulencia; por otro lado, cuando se buscó una posible asociación entre el contenido de genes de virulencia y el origen de las muestras (es decir de donde fueron aisladas), el único vínculo estadísticamente significativo fue que aquellas muestras aisladas a partir de harinas presentaron un menor contenido de tales genes (Fig. 15)

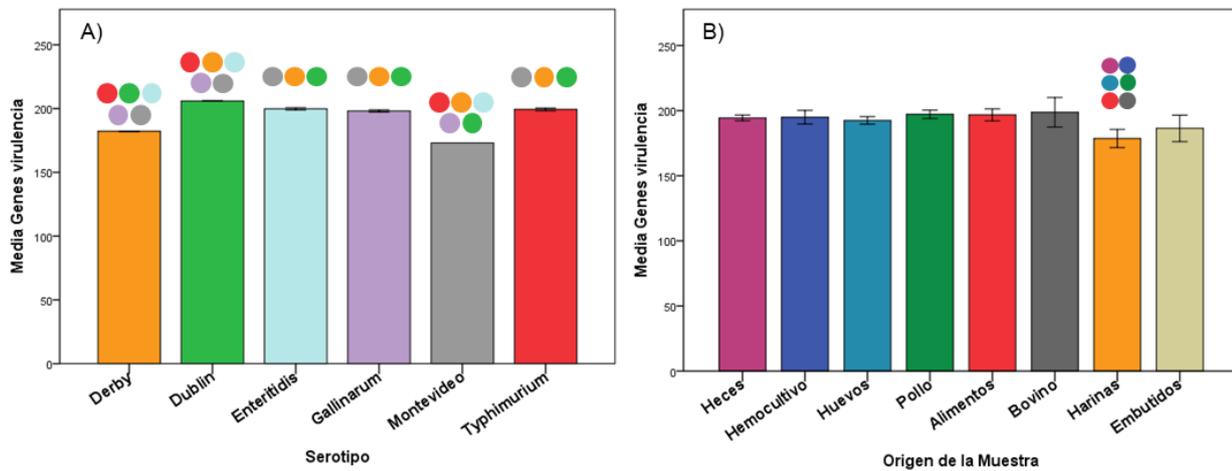


Figura 15. Gráficos de comparación del número de genes predichos de virulencia en función del serovar (panel A), y en función del origen de aislamiento de las muestras (panel B). Se graficaron las distintas medias y los correspondientes desvíos estándar. Los círculos coloreados indican diferencias estadísticamente significativas, y sus colores marcan entre que serovares se encontró tales diferencias.

Por otra parte, el estudio de predicción de genes de virulencia mostró que únicamente aquellos aislamientos pertenecientes a los serovares Agona, Dublín y Gallinarum presentaban 11/12 genes ligados al sistema de secreción de tipo VI (T6SS); la única excepción a esto la constituyó un único aislamiento de *S. Enteritidis* de origen canino. Asimismo, aquellos aislamientos pertenecientes a los serovares Anatum, Cerro, Derby, Give, Montevideo, Orianenburg, Panamá y Paratyphi B no mostraron genes relacionados a fimbrias de tipo 4. Otro patrón observado a partir del *heatmap* fue la presunta ausencia de genes ligados al metabolismo de alantoína en aquellos aislamientos pertenecientes a los serovares Hadar, Heidelberg, Montevideo y Panamá. En otro orden, también se vio algunas variaciones menores (ausencia o presencia de genes puntuales) ligadas a un serovar específico. A modo de ejemplo, en los aislamientos de *S. Cerro*, *S. Choleraesuis*, *S. Livingstone* y *S. Montevideo* no se detectaron los genes *rfbD*, *rfbF* y *rfbG*, ligados a la síntesis del antígeno O del LPS; asimismo, mientras que *S. Dublín*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* y *S. Hadar* carecían del gen *rfbD*, en los aislamientos de los serovares Anatum, Give y Seftenberg no se encontró los genes *rfbF* ni *rfbG*. Del mismo modo, únicamente en los aislamientos pertenecientes a los

serovares GIVE, Montevideo, Orianenburg y Panamá fue posible detectar la presencia de genes asociados a producción de toxinas como *cdtA*, *pltA* y *pltB* (Fig. 16).

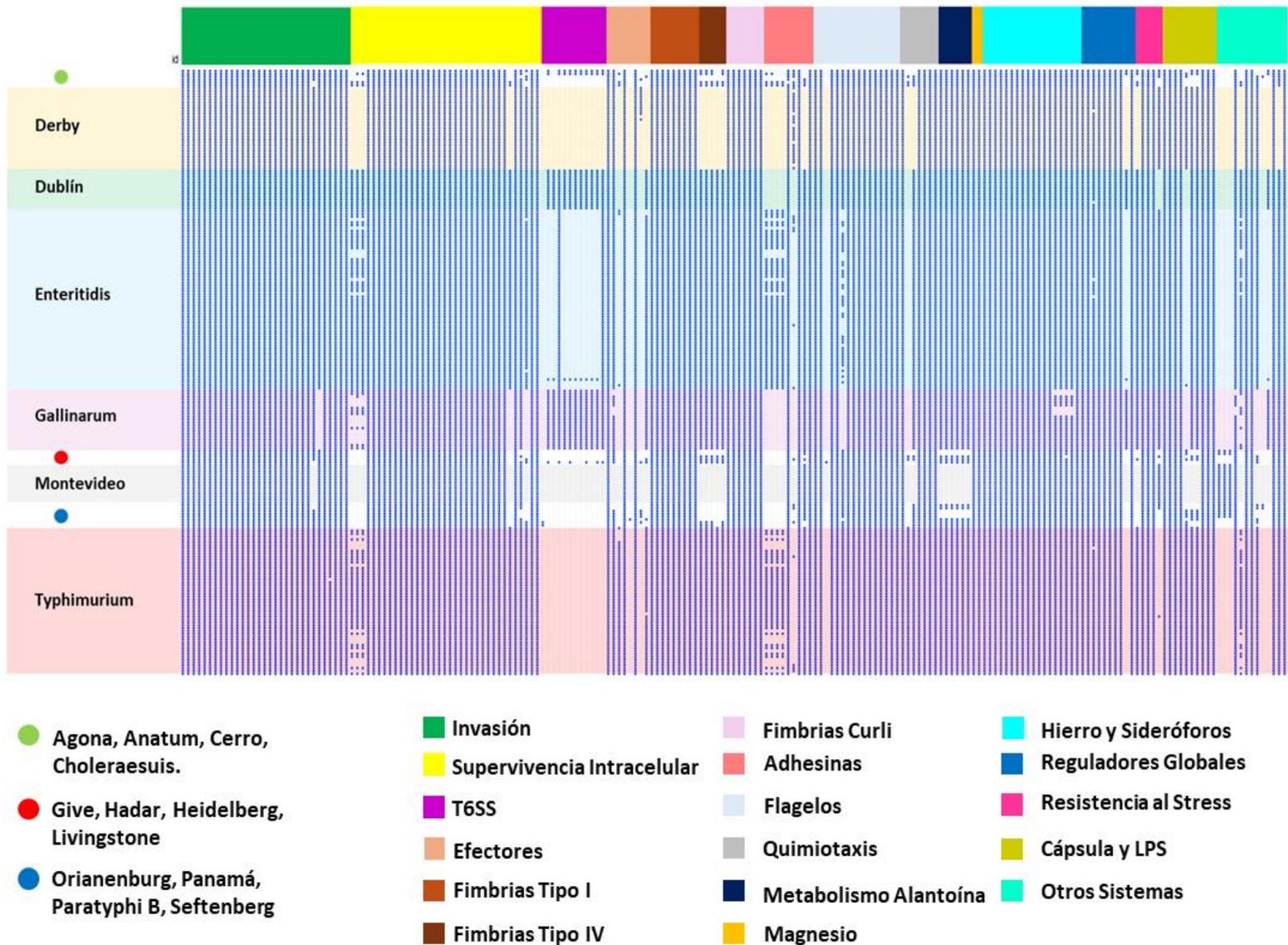


Figura 16. Mapa de presencia/ausencia de los genes de virulencia, predichos a partir de las secuencias nucleotídicas de todos los genomas estudiados en la presente tesis. Los genes detectados se marcan como puntos azules. Por otra parte, para la generación de esta imagen los genomas analizados fueron ordenados por serovar alfabéticamente, mientras que los genes de virulencia predichos fueron agrupados según su función. Los serovares minoritarios ($n \leq 3$) se agrupan y representan como círculos de color

7.3. Sistemas de Defensa Bacterianos

Se llevó a cabo la búsqueda de sistemas de defensa bacterianos, que pueden jugar un papel en la regulación de la captación de ADN exógeno, entre otros, distintos elementos genéticos móviles asociados a genes RAM, mediante eventos de transferencia horizontal de genes. A modo general, se identificaron 49 genes diferentes vinculados a sistemas de defensa antifágicos en la colección de genomas analizados; la media de genes de defensa por genoma fue de 6.5, con valores mínimos y máximos de 3 y 14 genes, respectivamente. Por otra parte, al analizar la cantidad de genes de defensa en los distintos serovares se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En este orden, *S. Typhimurium* fue el serovar con mayor media de tales genes ($\bar{x} \approx 11$), mientras que *S. Enteritidis* presentó la menor media de genes de defensa ($\bar{x} \approx 4$); por otro lado, cuando se realizó el mismo análisis, pero basado en el origen de las muestras, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 17).

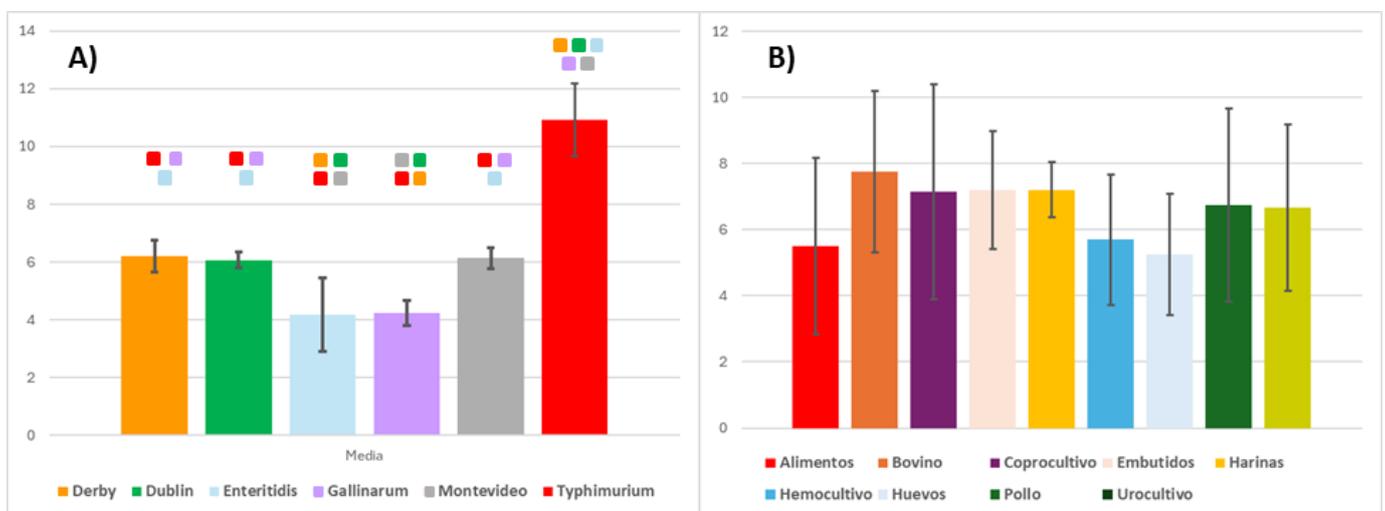


Figura 17. Gráficos comparativos de medias de genes de defensa bacterianos en función del serovar (panel A), y en función del origen de las muestras (panel B), con sus respectivos desvíos estándar. Los bloques coloreados encima de las distintas barras indican diferencias estadísticamente significativas, y sus colores marcan entre que serovares se encontró dichas diferencias.

En función de su mecanismo molecular de acción, los distintos genes antifágicos pueden agruparse en cuatro grandes categorías: a) degradación de ácidos nucleicos (aquellos sistemas de cortan directamente ADN o ARN exógeno); b) modificación o depleción de nucleótidos (aquellos que modifican químicamente y/o reducen los nucleótidos disponibles

para la síntesis de ácidos nucleicos); c) disrupción de membrana o sacrificio celular (aquellos que inducen la muerte de la célula infectada para proteger a la población bacteriana); d) Otros con mecanismos de acción alternativos o cuya función no ha sido completamente dilucidada (Martínez M, et al., 2024). En este sentido, los genes más frecuentemente detectados fueron aquellos pertenecientes al grupo de degradación de ácidos nucleicos, y dentro de éste los genes codificantes para sistemas CRISPR/Cas y genes codificantes para sistemas de restricción-modificación de tipo III (n=212 c/u); el segundo grupo en abundancia correspondió al de disrupción de membranas/infección abortiva, siendo los genes codificantes para Retrones de tipo II y para el sistema PD-T4-1 los más frecuentes (n=74 y n= 53, respectivamente). El tercer grupo en abundancia correspondió al de sistemas de depleción/modificación de ácidos nucleicos, siendo los genes codificantes para sistemas Mokosh_II y PARIS_II los más frecuentemente hallados (n=57 y n=55, respectivamente). Por otra parte, dentro de la cuarta categoría, el sistema más frecuentemente hallado fue CBASS I, presente en 113 de los genomas estudiados (Fig. 18).

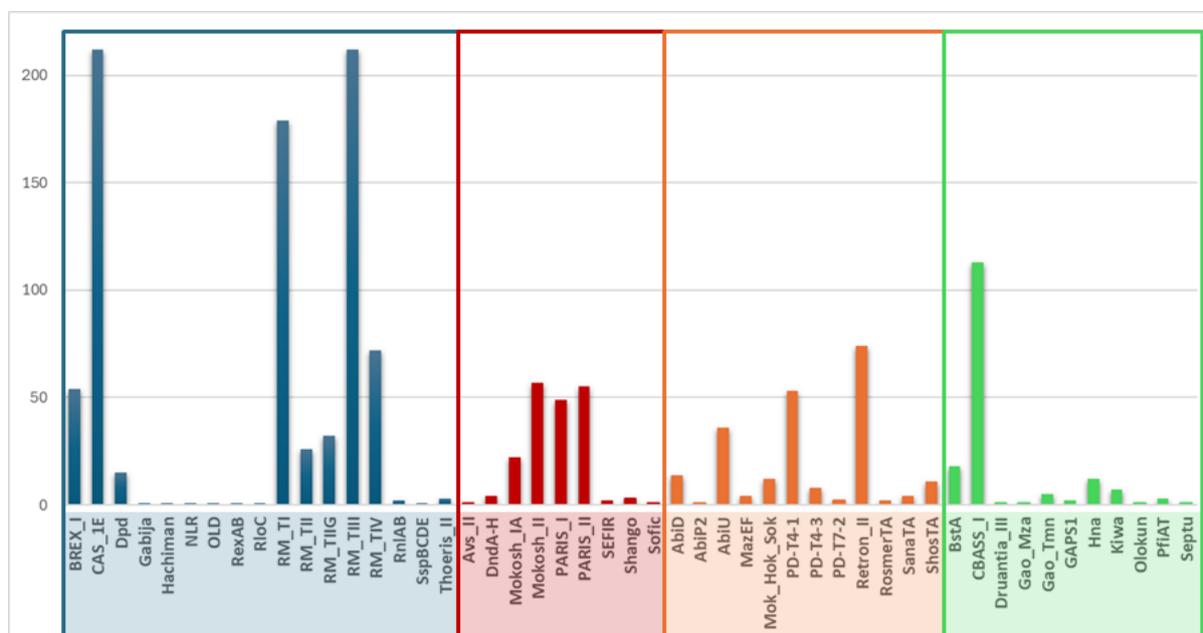


Figura 18. Histograma de los distintos genes bacterianos de defensa, agrupados según el mecanismo molecular de acción. Las barras y recuadro azules corresponden a genes codificantes para sistemas de degradación de ácidos nucleicos; las barras y recuadro rojos representan a genes codificantes para sistemas de depleción/modificación de ácidos nucleicos; las barras y recuadro naranjas indican genes codificantes para sistemas de disrupción de membrana/infección abortiva; las barras y recuadro verdes corresponden a genes ligados a sistemas alternativos y/o poco estudiados.

En otro orden, a partir del resultado del programa DefenseFinder se creó una matriz de presencia/ausencia de los distintos genes de defensa bacterianos; los resultados fueron luego agrupados según el modo de acción y según los distintos serovares. Por una parte, el *heatmap* resultante mostró la existencia de patrones de genes de defensa asociados a serovares particulares (Fig. 19). En este sentido, independientemente de la presencia de los sistemas CRISPR/Cas y R-M de tipo III presente en todos los aislamientos, el serovar Derby presentó además los sistemas R-M de tipos I y IIG, AbiU y CBASS I; por su parte, el serovar Dublín mostró los sistemas R-M de tipo II, AbiD y BstA; el serovar Enteritidis mostró los sistemas R-M de tipo I y CBASS I; el serovar Gallinarum, presentó los sistemas Mokosh IA y CBASS I; el serovar Montevideo, por su parte, presentó los sistemas Dpd, R-M de tipo IV y Retron II. Finalmente, los sistemas BREX I, R-M de tipos I y IV, PARIS II, Retron II y Mokosh II estaban presentes en todos los genomas del serovar Typhimurium; por su parte los siguientes sistemas fueron encontrados en números variables de genomas: PD-T4-1 (50/52 genomas), PARIS I (47/52 genomas), Hna (10/52 genomas), ShosTA (9/52 genomas), Kiwa y Mok_Hok_Sok (7/52 genomas c/u), entre otros. Además, los genomas de *S. Panamá* portaban sistema DndA-H, y en 2/3 genomas se halló también el sistema RnlAB. Por otro lado, además de los sistemas previamente mencionados, dentro de los distintos serovares con mayor representación en nuestra colección se encontraron cepas que portaban desde 1 a 10 de otros sistemas de defensa. Asimismo, dentro de los genomas analizados se hallaban serovares representados únicamente por 2 aislamientos; en este sentido, los genomas de los serovares Choleraesuis, Give y Orianenburg parecerían poseer patrones definidos de sistemas de defensa (Choleraesuis: R-M de tipo II y PD-T4-3; Give: R-M de tipo II, SEFIR, PD-T4-3 y RosmerTA; Orianenburg: R-M de tipo II, Thoeris II, PD-T4-3, ShosTA y PfiAT); por el contrario tanto los genomas de aislamientos de *S. Agona* como los de *S. Seftenberg* mostraron variabilidad intraserovar. De todos modos, dado lo poco representado de estos cinco serovares no es posible establecer asociaciones con significancia estadística.



Figura 19. *Heatmap* mostrando la distribución de los distintos genes de defensa bacterianos (líneas azules) presentes en los distintos serovares de *S. enterica*. El recuadro azul corresponde a genes asociados a sistemas de degradación de ácidos nucleicos, el recuadro rojo a genes asociados a sistemas de depleción/modificación de nucleótidos, el recuadro naranja a genes asociados a sistemas de disrupción de membrana/infección abortiva y el recuadro verde a aquellos genes con otros mecanismos de actividad o poco caracterizados. El círculo verde corresponde a los serovares Agona, Anatum, Cerro y Choleraesuis; el círculo rojo corresponde a los serovares Give, Hadar, Heidelberg, y Livingstone; el círculo azul corresponde a los serovares Orianenburg, Panamá, Paratyphi B y Seftenberg.

Por otro lado, entre los serovares mayoritarios se identificaron aislamientos con perfiles discordantes de sistemas de defensa bacterianos. En tales aislamientos, la mayoría de dichos sistemas discordantes estaban codificados en el cromosoma; no obstante, otros fueron hallados en plásmidos conjugativos, plásmidos movilizables y no movilizables (tabla 3).

Posteriormente, se buscó la existencia de posibles asociaciones entre los distintos genes de defensa bacterianos y aquellos serovares con mayor representación en la colección de genomas analizados, mediante un análisis de correspondencia. En tal sentido, del gráfico resultante se desprende existe una asociación estadísticamente significativa entre *S. Typhimurium* con genes/sistemas de defensa como PARIS I y II, BREX, Mokosh II y PD-T4-1; por otra parte, si bien los demás sistemas de defensa que aparecen cercanos en el plano con *S. Typhimurium* no están presentes en todos los genomas analizados de dicho serovar, su posible asociación es “más fuerte” que con los restantes serovares (Fig. 20).

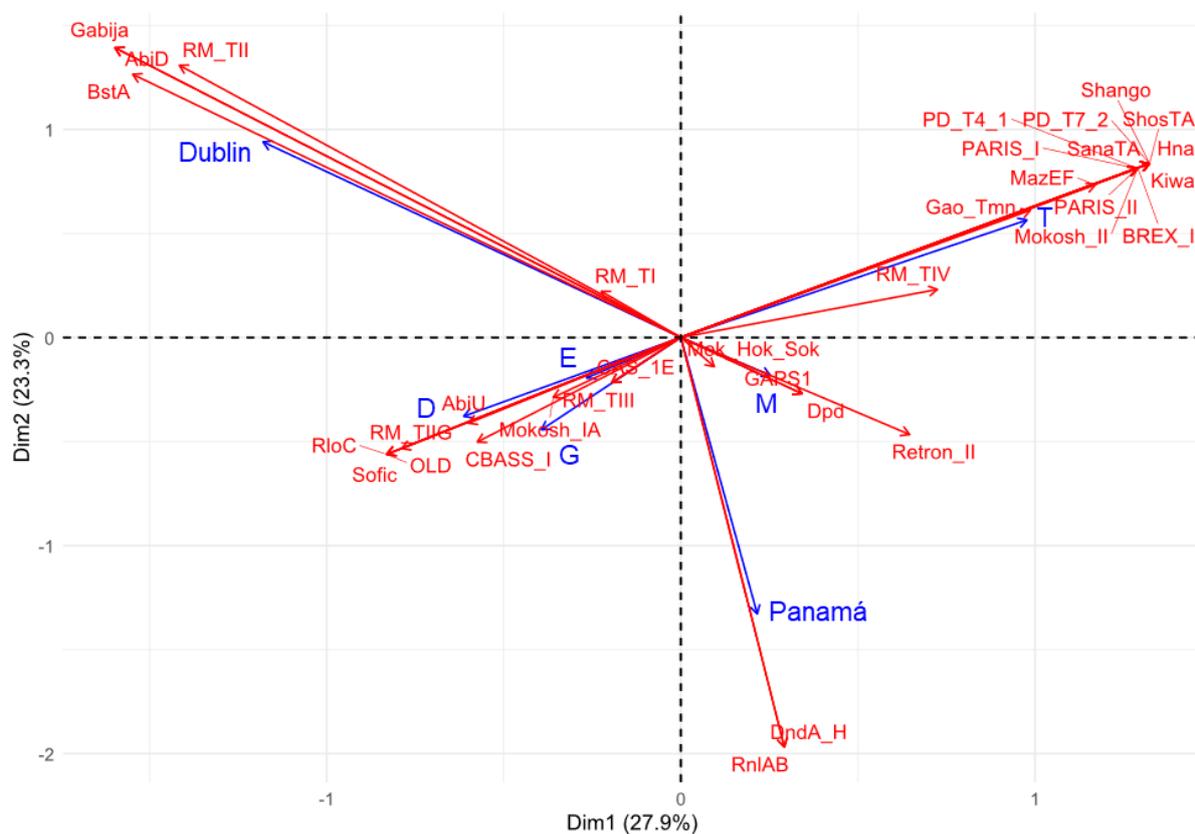


Figura 20. Análisis de correspondencia entre los diferentes genes de defensa bacterianos (rojo) y los serovares mayoritarios presentes en nuestra muestra (azul) [D: Derby; E: Enteritidis; G: Gallinarum; Montevideo; T: Typhimurium]. Los ejes denominados Dim 1 y Dim 2 explican o representan un 51.2% de la variación observada en la matriz de correspondencias; por otra parte, aquellos serotipos y sistemas/genes de defensa que están cerca en el plano Dim 1 y Dim 2 indican asociación, mientras que la dirección y la longitud de los distintos vectores representan la asociación de los distintos sistemas con los serovares, y cuanto contribuye ese sistema o serovar a la varianza representada (a mayor largo = mayor relevancia).

Por otro lado, los serovares Enteritidis, Montevideo, Gallinarum y Derby, se agrupan más cercanamente al centro, lo que indicaría que poseen perfiles más generalistas con relación a los sistemas de defensa; sin embargo, la cercanía entre los sistemas AbiD, BstA, Gabija y R-

M de tipo II y el serovar Dublín sugieren que estos sistemas serían más frecuentes en dicho serovar. Por su parte, el serovar Panamá presenta una asociación fuerte con los sistemas DndA-H y RnlAB. Además, se llevó a cabo un test de Spearman para determinar si existe alguna correlación de entre el número de genes de defensa bacterianos y el número de genes RAM. De esta manera, se vio que efectivamente, en la colección de aislamientos analizados, existe una correlación positiva débil entre la cantidad de genes RAM y el número de sistemas de defensa antifágicos (Fig. 21).

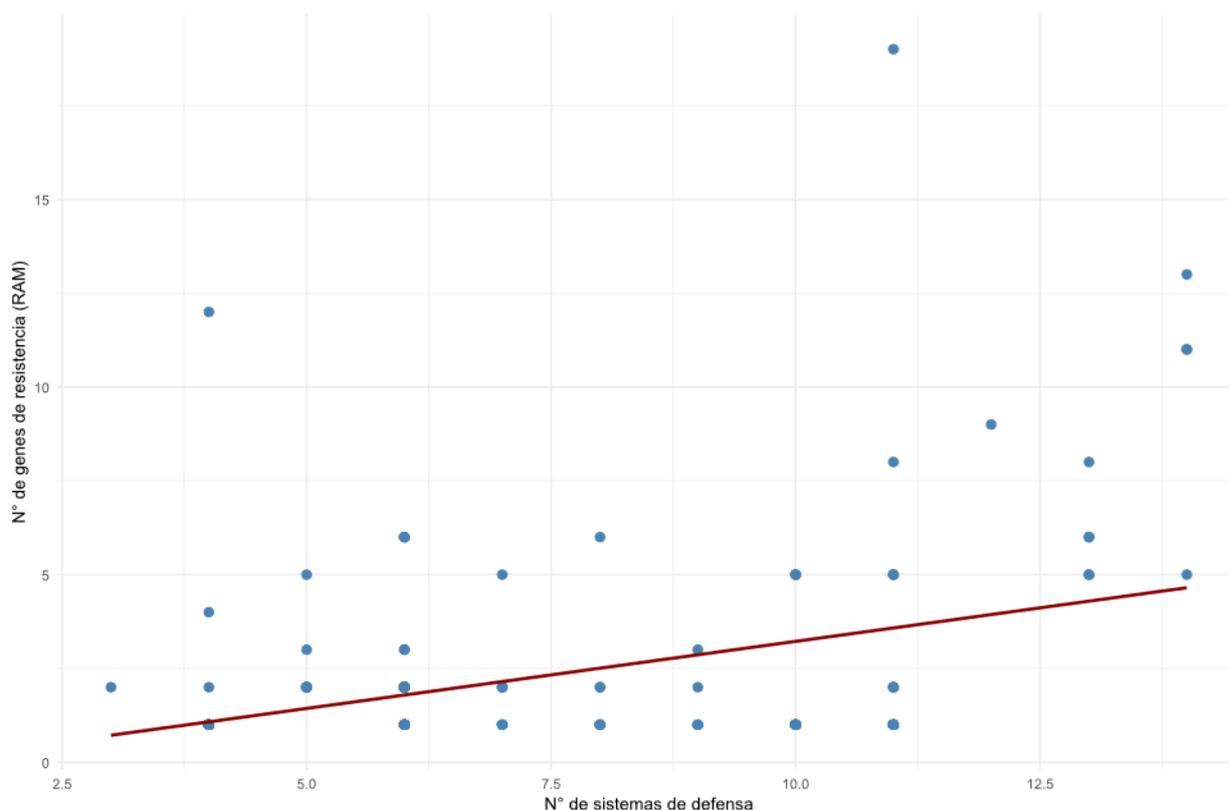


Figura 21. Correlación entre el número de genes de resistencia antibiótica y el número de sistemas de defensa bacterianos. El análisis se llevó a cabo mediante el test de correlación de Spearman ($\rho \approx 0.39$, $p < 0.001$). La línea roja representa un ajuste lineal para su mejor comprensión. Se observa una débil correlación positiva entre ambas variables.

7.4. Genes de resistencia antibiótica

7.4.1. Descripción

Para la predicción de genes de resistencia a los antibióticos se utilizó las bases de datos de Resfinder, CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) y de la NCBI

(National Center for Biotechnology Information), con similar resultado. No se tuvieron en cuenta mutaciones en genes cromosómicos (p.ej. girasas), ni bombas de eflujo/porinas intrínsecas. Del mismo modo, tampoco se tuvo en cuenta la presencia del gen de resistencia a aminoglucósidos *aac(6)-Iaa*, intrínseco a todos los genomas de *Salmonella* analizados en la presente tesis.

De esta manera, se hallaron 212 genes distribuidos en 68 genomas de los 212 analizados. De estos 68, la mayoría (n=37) presentaron solamente un gen RAM y, por otro lado, en cinco genomas se encontraron 10 o más genes RAM (tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana en los genomas analizados.

N° de genes RAM	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	19
N° de genomas	37	4	1	11	7	2	1	2	1	1	1

Asimismo, los genes RAM encontrados se agruparon en doce familias distintas según el tipo de antibiótico frente al cual conferirían resistencia. En este sentido, y en orden decreciente, los genes más representados fueron los de resistencia a aminoglucósidos, genes de resistencia a β -lactámicos, genes de resistencia a fosfomicina y genes de resistencia a tetraciclina (Fig. 22).

Por otra parte, la comparación de la media de genes RAM entre los distintos serotipos de mayor representación (ANOVA de Welch, $p < 0.05$) reveló que los serovares Typhimurium y Derby presentaban el mayor contenido, mientras Dublín, Enteritidis, Gallinarum y Montevideo (en orden decreciente) mostraron las medias más bajas con diferencias estadísticamente significativa (Fig. 23 A).

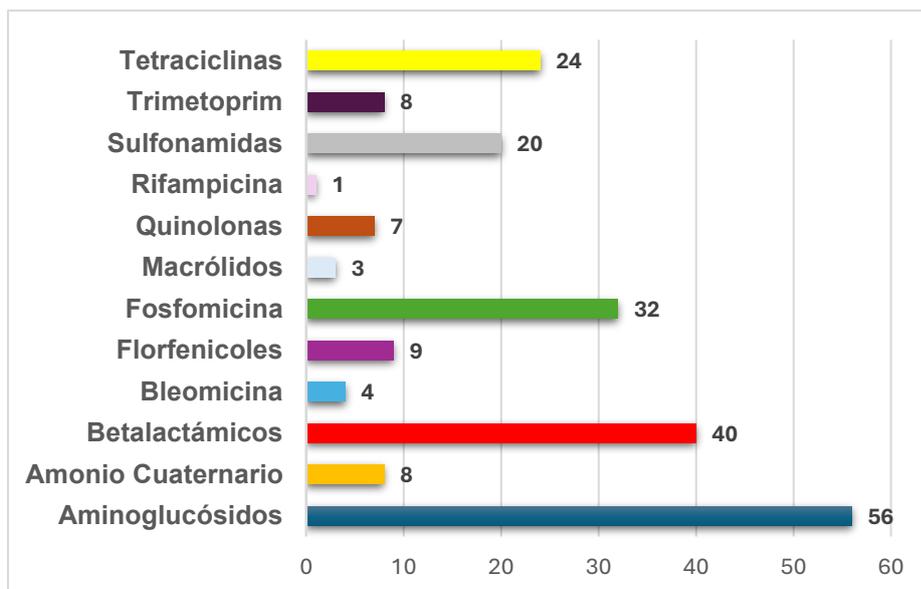


Figura 22. Gráfico de la distribución de los genes RAM detectados en la presente tesis. Los mismos se agrupan en función de las distintas familias de antibióticos, y se indica el número total de genes asociados a cada una de ellas.

Asimismo, la comparación de medias de genes RAM en función del origen de las muestras mostró que aquellos aislamientos recuperados a partir de coprocultivos mostraban un mayor número de genes de resistencia, mientras que los aislamientos obtenidos a partir de bovinos presentaban la menor media; no obstante, dada la variabilidad en la cantidad de genes RAM entre aislamientos recuperados de un mismo origen, las diferencias entre medias no siempre resultaron estadísticamente significativas (Fig. 23 B).

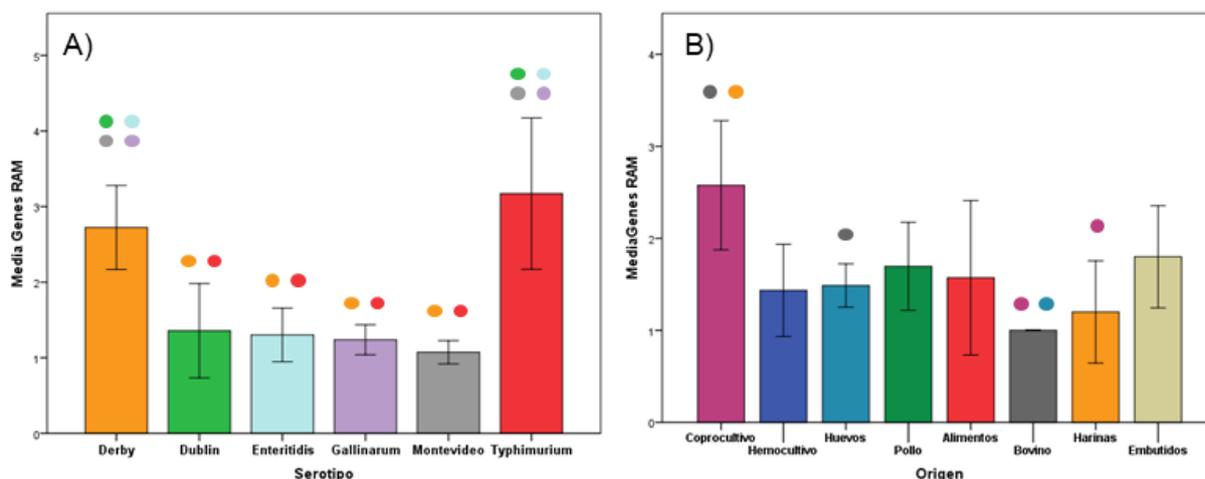


Figura 23. Comparación de la media de genes resistencia a los antibióticos en función del serotipo (panel A) y en función del origen de la muestra (panel B). Los círculos coloreados indican diferencias estadísticamente significativas y los colores indican frente a cuál/cuales se encontró dicha diferencia. Las barras de error representan los desvíos estándar correspondientes. En todos los casos se adoptó un $p < 0.05$.

Del mismo modo, cuando se buscó la existencia de posibles vínculos entre la cantidad de genes RAM, el número de genes de virulencia y/o el número de grupos de incompatibilidad, el análisis de correlación mostró, no se encontró correlación estadística entre el contenido de genes RAM y de genes de virulencia; por otro lado, se vio que había una correlación leve entre genes RAM y grupos de incompatibilidad plasmídica así como también la existencia de una correlación más acentuada entre genes de virulencia y grupos de incompatibilidad plasmídica, siendo en ambos casos estadísticamente significativa (tabla 5).

Tabla 5. Resultado del análisis de correlación.

	Genes RAM	Genes de virulencia	Grupos de incompatibilidad
Genes RAM	1	-0,058	0,359**
Genes de virulencia	-0,058	1	0,648**
Grupos de incompatibilidad	0,359**	0,648**	1

** La correlación es significativa con un $p < 0.01$ (2 colas).

Por su parte, el estudio de la variación temporal del número de genes RAM por genoma mostró dos picos; el primero comprendido entre el final de la década de 1970 y los primeros años de la década de 1980, y el segundo pico comenzando a principios de la década del 2010 hasta la época actual (Fig. 24).

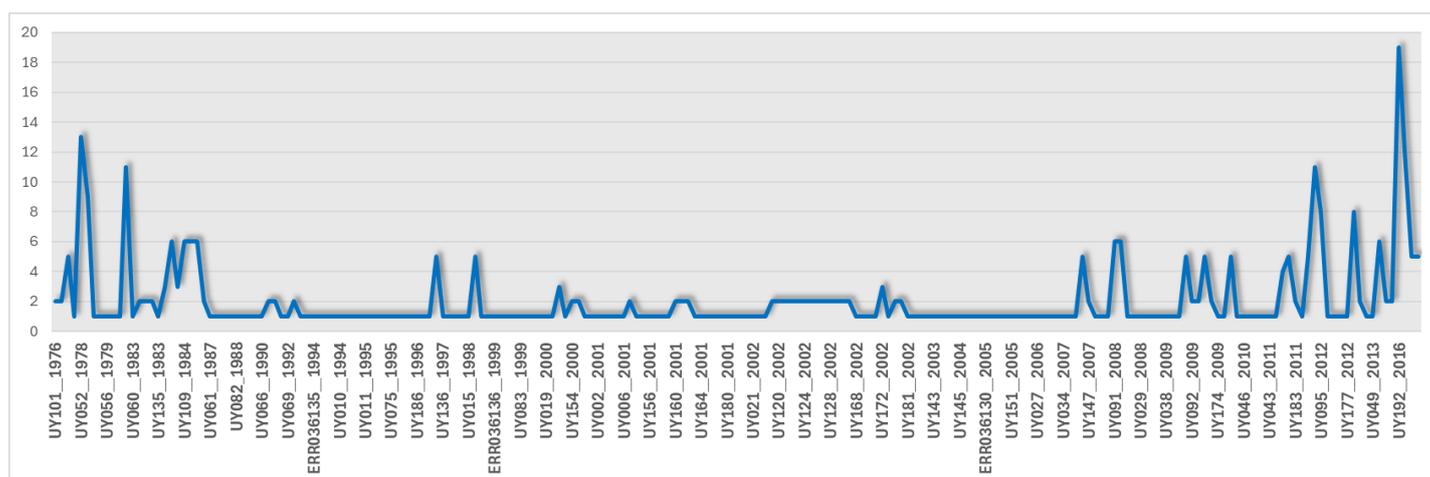


Figura 24. Gráfica de la variación en el número de genes detectados en los genomas de *S. enterica* a lo largo del tiempo. Los valores representan la cantidad de genes identificados por genoma en función del año de recolección.

7.4.2. Genes codificantes de β -lactamasas

Entre los genomas analizados se encontraron 40 genes que codificaban para β -lactamasas, 27 correspondían a la clase A, 1 a la clase B, 4 a la clase C y 8 a la clase D, de acuerdo con la clasificación de Ambler (Ambler RP, 1980) (Fig. 25). Dentro de los genes codificantes para enzimas de clase A, la mayoría correspondieron β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA) (n=18), mientras que el resto codificaban para β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (n=9).

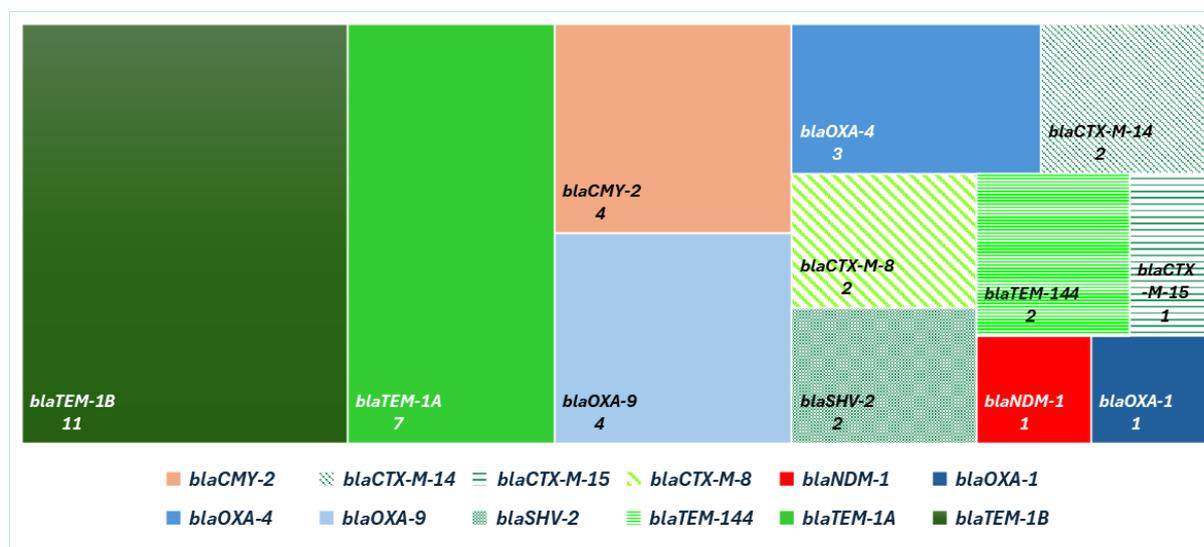


Figura 25. Gráfico jerárquico de los genes codificantes de β -lactamasas. Cada gen se representa como un rectángulo, en el cual el tamaño es proporcional a su representación en la muestra (número por debajo del nombre). El esquema de colores representa a su clasificación en el esquema de Ambler. Así, tonos de verdes representan a la clase A; a su vez, dentro de esta los colores sólidos indican BLEAs, mientras que aquellos con trama representan BLEEs; en rojo aparece la clase B; en naranja la clase C; en tonos azulados la clase D.

7.4.2.1. β -lactamasas de Espectro Ampliado

Las BLEAs identificadas correspondieron a TEM-1a y TEM-1b. Desde el punto de vista enzimático ambas variantes presentan idéntico perfil hidrolítico, ya que su estructura primaria (secuencia aminoacídica) es idéntica; sin embargo, a nivel nucleotídico, el alineamiento de secuencias muestra la presencia de tres cambios silenciosos. A nivel del entorno genético, *blaTEM-1a* se encontró asociada al menos a 2 tipos de entornos inmediatos distintos; primero, formando parte del transposón Tn3 (*tnpA*, *tnpR*, *blaTEM-1*), estando dicho transposón a su vez

integrado en distintos plásmidos (IncI1, IncF). Segundo, *bla*_{TEM-1a} fue hallado inserto en plásmidos de tipo IncI1, pero formando parte de un transposón derivado de Tn2 designado como Tn1331, conformado por los genes de la transposasa y la resolvasa, seguido por los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-Ib* y *ant(3'')-Ia*, luego la β-lactamasa *bla*_{OXA-9} y una recombinasa putativa, y finalmente el gen *bla*_{TEM-1a} (Fig. 26). Este entorno fue hallado solo en genomas de *S. Derby*, recuperadas de coprocultivos; por su parte, el alineamiento de dicho entorno contra bases de datos nucleotídicas muestra que el mismo se encuentra ampliamente distribuido entre Enterobacteriales.

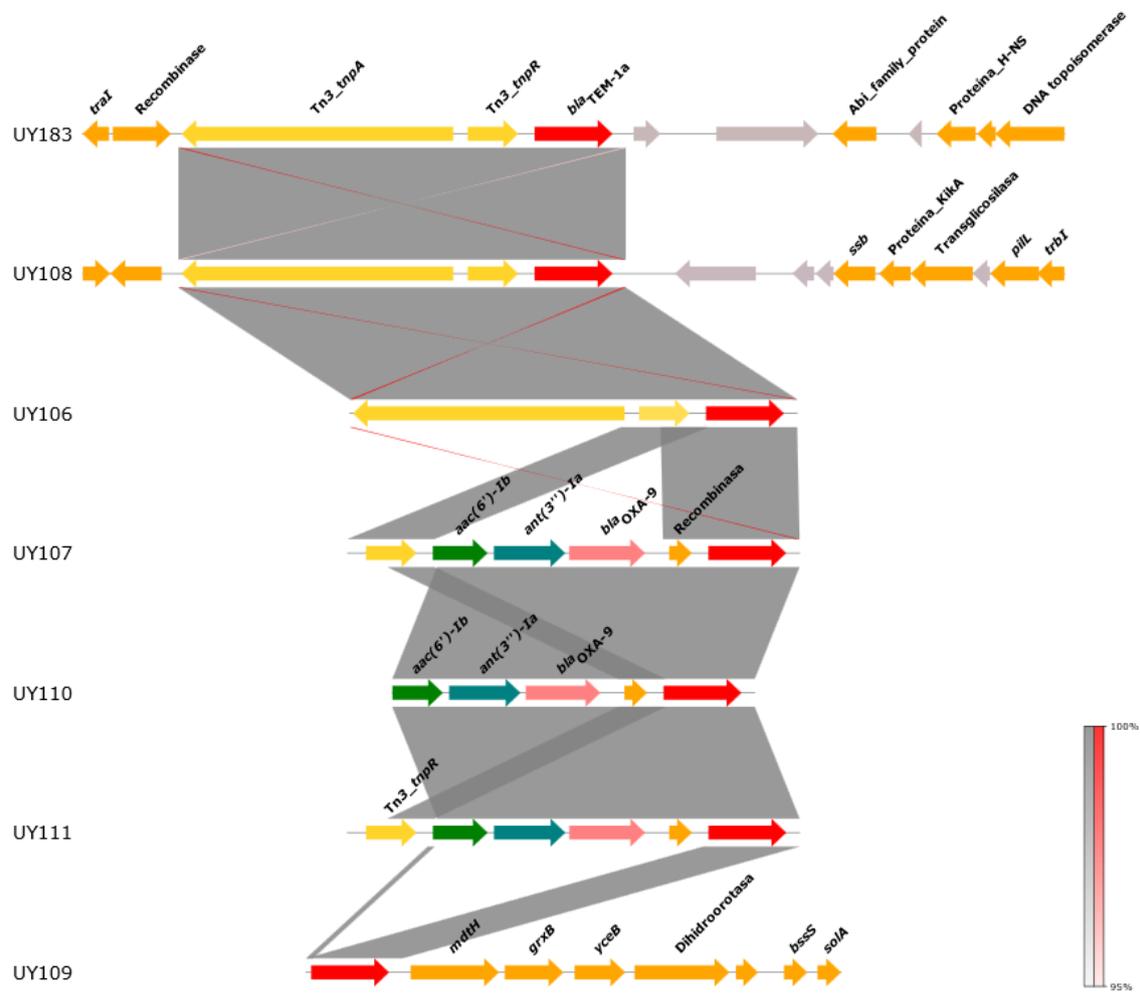


Figura 26. Comparación de entornos del gen *bla*_{TEM-1a} (flechas rojas); las flechas amarillas indican genes relacionados a transposones, las flechas naranjas indican genes varios y proteínas; las flechas grises indican ORFs putativos. Los bloques grises indican regiones de identidad nucleotídica, la intensidad de estos varía en función del porcentaje de identidad. Las líneas rojas indican inversiones.

El gen *bla*_{TEM-1b} se mostró también asociado a dos contextos genéticos distintos; primero, formando parte del transposón Tn3 mencionado previamente, y segundo, se encontró precedido de la secuencia de inserción IS5075, el transposón TnAS3 e IS15D, y corriente abajo se continuaba por *aac(3)-IIa* y las secuencias de inserción ISKpn11 e ISKpn12 (Fig. 27).

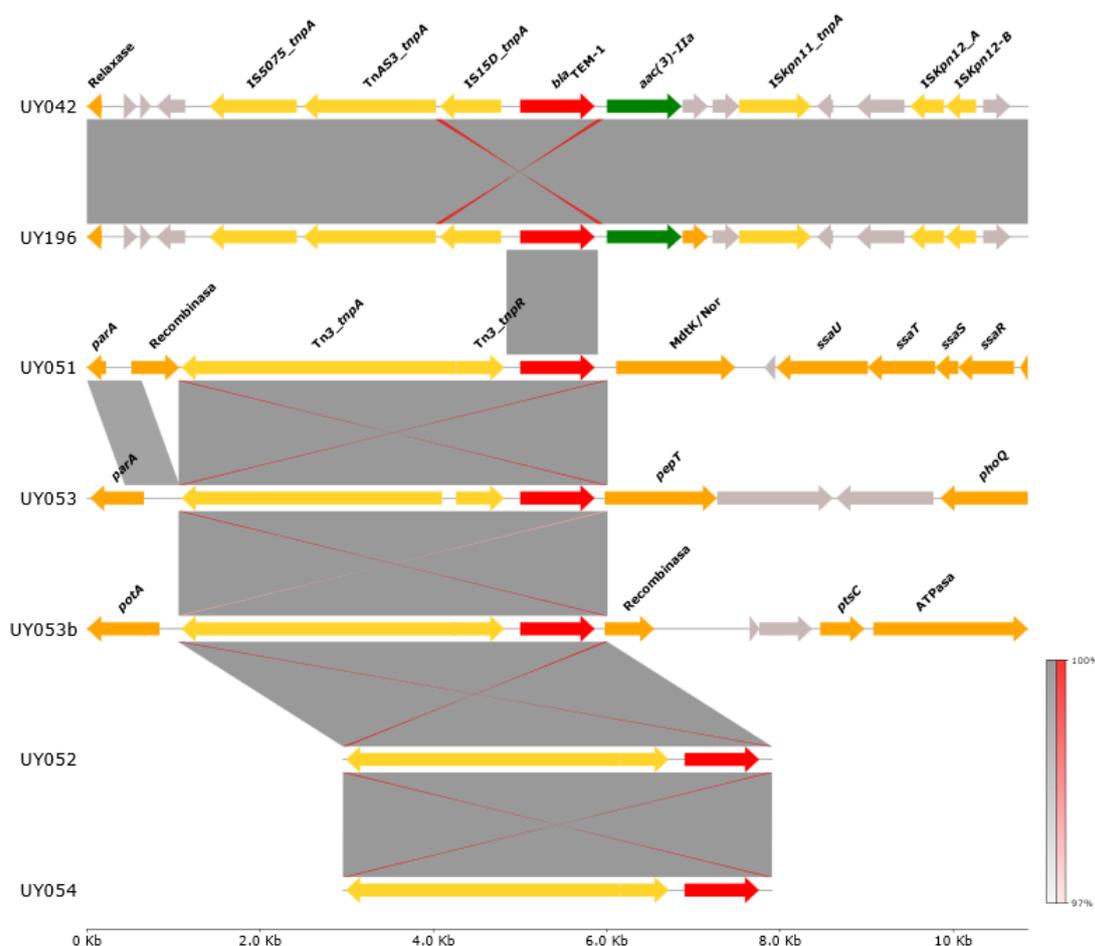


Figura 27. Comparación de entornos del gen *bla*_{TEM-1b} (flechas rojas); las flechas verdes indican el gen de resistencia a aminoglucósidos *aac(3)-IIa*; las flechas amarillas indican genes relacionados a transposones, las flechas naranjas indican genes varios y proteínas; las flechas grises indican ORFs putativos. Los bloques grises indican regiones de identidad nucleotídica, la intensidad de estos varía en función del porcentaje de identidad. Las líneas rojas indican inversiones. La cepa UY053 presentó dos copias *bla*_{TEM-1b} que en la figura se muestran como UY053 y UY053b.

Este último entorno, fue encontrado en dos genomas de *S. Typhimurium* recuperados en distintos años; uno de ellos proveniente de una cepa aislada a partir de pollos, y asociado a un plásmido de tipo IncFIA/FIB, y el otro a partir de un coprocultivo y asociado a un plásmido de tipo IncI1.

La búsqueda de homologías contra bases de datos mostró únicamente resultados parciales, siendo lo más cercano una región de un plásmido IncC de un aislamiento de *C. freundii* reportado en la Rep. Checa. En tal sentido, la región de homología abarcaba sólo desde IS15D hasta ISKpn12.

7.4.2.2. β -lactamasas de Espectro Extendido

Como se mencionó anteriormente, se encontraron 9 genes codificantes para BLEEs en los genomas analizados, de estos cuatro correspondieron a genes derivados BLEAs (*bla*_{SHV-2} [n=2], y *bla*_{TEM-144} [n=2]), y los restantes a genes codificantes para BLEEs “congénitas” (no derivadas de BLEAs) (*bla*_{CTX-M-8} [n=2], *bla*_{CTX-M-14} [n=2], *bla*_{CTX-M-15} [n=1]).

SHV-2 fue la primera β -lactamasa plasmídica con actividad hidrolítica sobre cefalosporinas de tercera generación en ser reportada (Kliebe C, et al., 1985). En tal sentido, la diferencia entre SHV-1 (BLEA) y SHV-2 es una sustitución de un residuo de serina por una glicina en la posición 234, siendo dicha mutación la responsable por el cambio en el perfil hidrolítico (Garbarg-Chenon A, et al., 1990). Con relación al entorno genético de *bla*_{SHV-2}, ambos genes detectados en la colección estaban insertos en plásmidos de tipo IncI1, uno presente en una cepa de *S. Typhimurium* recuperada de un urocultivo en 2012, y el otro en una cepa de *S. Cerro*, aislada de un coprocultivo en 2013. Los dos plásmidos fueron tipificados como pST12 (CC12), y a grandes rasgos, la única diferencia entre ambos era la inserción del tándem ISSo4-IS $\mathit{Ppu7}$ corriente abajo del gen *parB*. Por otra parte, el gen *bla*_{SHV-2} estaba localizado en una región de genes accesorios y ORFs putativos, flanqueado corriente arriba por una copia de IS26 truncando un gen de una lactosa-permeasa, luego una ATPasa putativa y una proteína hipotética; por otra parte, corriente abajo estaba flanqueado por un hipotético regulador transcripcional, y luego los genes codificantes de L-treonato deshidrogenasa y de 3-oxo-tetronato kinasa (Fig. 28). Este contexto genético fue descrito en un fago de *E. coli* (Billard-Pomares T, et al., 2014), y se encuentra ampliamente difundido entre

Enterobacteriales, su presencia en dicho EGM explicaría el haber sido detectado en plásmidos pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad.

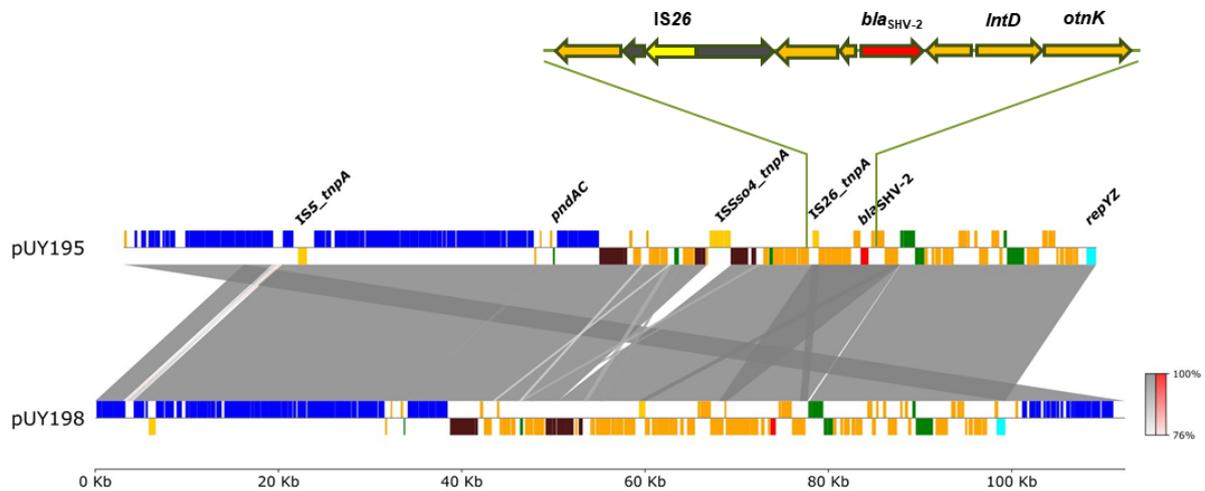


Figura 28. Entorno genético de *bla*_{SHV-2} y comparación de los plásmidos que portaban dicho gen. En el diagrama superior las flechas naranjas representan genes y ORFs putativos, las flechas en gris oscuro indican genes truncos/pseudogenes, la flecha amarilla representa a IS26, y la flecha roja representa a *bla*_{SHV-2}. En el diagrama inferior, los rectángulos azules representan genes de transferencia plasmídica; los rectángulos amarillos representan transposones y secuencias de inserción; los rectángulos verdes representan genes asociados a la estabilidad del plásmido; los rectángulos marrones indican genes asociados a la segregación plasmídica, y los bloques celestes representan genes asociados a la replicación plasmídica. Los rectángulos rojos representan genes RAM, y los bloques naranjas, genes varios y ORFs putativos. Los bloques en gris marcan regiones de homología (identidad $\geq 99\%$).

Por otra parte, el gen *bla*_{TEM-144} codifica para una BLEE con perfil de ceftazidimasa. Dicha enzima, derivada de TEM-1, fue descrita por primera vez en el año 2006 en Uruguay, y presentaba dos cambios aminoacídicos en relación con esta última, [R164C y E240K] que explicarían el cambio en el perfil de sustrato (Vignoli R, et al., 2006). El gen que codifica para dicha enzima se encontraba inserto en un pequeño plásmido de tipo ColE1, de unos 8.2 Kb, en dos aislamientos de *S. Panamá* obtenidos de huevos en el año 2002.

La región de resistencia estaba formada por tres marcos abiertos de lectura, los genes *tnpA-tnpR* y *bla*_{TEM-144} constituyendo el transposón Tn2*, derivado de Tn3; la región replicativa de estos plásmidos estaba constituida por RNAII y RNAI (encargados de promover y regular la replicación, respectivamente). Corriente debajo del gen codificante de la β -lactamasa, se encontró el gen *mob* y un elemento *oriT*, asociados a la movilización del plásmido. El resto del plásmido estaba compuesto por ORFs putativos sin función conocida.

Resultó interesante observar que el ensamblado del genoma de los aislamientos portadores de *bla*_{TEM-144} mostró la estructura del plásmido descrito anteriormente, seguido de una duplicación (repetido directo) de toda la unidad transponible), todo inserto en un *contig* cromosómico (Fig. 29). Esto sugiere la ocurrencia de una posible integración de estos plásmidos al cromosoma de la célula hospedadora. En tal sentido, se ha descrito que, durante este proceso, los transposones pertenecientes a la familia Tn3 generan un cointegrado en el cual ambas moléculas de ADN (donante y ADN blanco) se unen por medio de copias repetidas directas del transposón. Luego este cointegrado sería resuelta por un mecanismo de recombinación específica de sitio, mediada por la resolvasa (Nicolas E, et al., 2015).

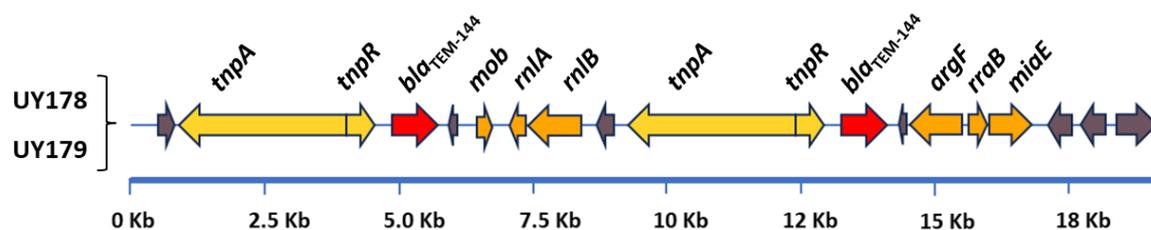


Figura 29. Alineamiento del entorno genético de *bla*_{TEM-144}, en los aislamientos UY178 y UY179 (indicados por la llave a la izquierda del mapa), donde se evidencia de formación de cointegrados, a través de los repetidos directos de la unidad transponible. Las flechas amarillas representan los genes asociados a transposición; las flechas naranjas representan genes con función conocida; las flechas rojas representan los genes RAM; las flechas gris oscuras representan ORFs putativos sin función conocida.

Con relación a las β -lactamasas “congénitas”, se encontraron genes que codificaban para distintas enzimas de la familia CTX-M. En primer lugar, el gen *bla*_{CTX-M-8} fue hallado en el genoma de dos aislamientos de *S. Typhimurium*, recuperados en el año 2012 a partir de coprocultivos; ambos genes se hallaban insertos en plásmidos de tipo IncI1, secuenciotipo pST113. En tal sentido, *bla*_{CTX-M-8} se encontraba flanqueado a ambos lados por dos copias de IS26, en orientación directa; esta unidad transponible a su vez se encontraba inserta entre el gen *klcA*, que codifica para una proteína antirrestricción, y los genes de estabilidad plasmídica

umuC-stbB-stbA (Fig. 30). Por otra parte, no se halló otros genes de resistencia en dichos plásmidos.

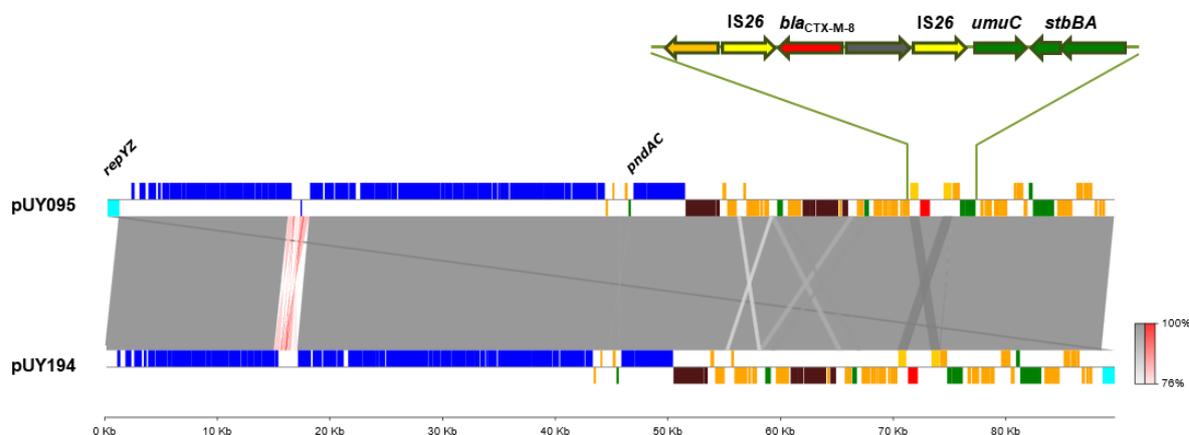


Figura 30. Entorno genético de *bla*_{CTX-M-8} y comparación de los plásmidos que portaban dicho gen. En el diagrama superior las flechas naranjas representan ORFs putativos, la flecha en gris oscuro indica genes truncos/pseudogenes, las flechas amarillas representan a IS26, y la flecha roja representa a *bla*_{CTX-M-8}; las flechas verdes representan genes de estabilidad plasmídica. En el diagrama inferior, los rectángulos azules representan genes de transferencia plasmídica; los rectángulos amarillos representan transposones/secuencias de inserción; los rectángulos verdes representan genes asociados a la estabilidad del plásmido; los rectángulos marrones indican genes asociados a la segregación plasmídica, y los bloques celestes representan genes asociados a la replicación plasmídica. Los rectángulos rojos representan genes RAM, y los bloques naranjas, genes varios y ORFs putativos. Los bloques en gris marcan regiones de homología (identidad \geq 99%), y las líneas rojas indican inversiones de ADN.

El alelo *bla*_{CTX-M-8} fue descrito por primera vez en Brasil en el año 2000, estando presente en aislamientos de *E. aerogenes*, *E. cloacae* y *C. amalonaticus*; las propiedades catalíticas de esta variante mostraron ser similares a la de otros miembros de esta familia de enzimas, teniendo mejor actividad frente a cefotaxima que frente a ceftazidima (Bonnet R, et al., 2000). Con relación a este entorno genético, la búsqueda de homologías contra bases de datos nucleotídicas, mostraron que esta plataforma se encuentra bastante conservada y ampliamente distribuida a nivel mundial y en distintas especies bacterianas (Eller C, et al., 2014; Ferreira C, et al., 2014; Norizuki C, et al., 2017). Del mismo modo, la plataforma Inc11/pST113/*bla*_{CTX-M-8}, ha sido detectada también en enterobacterias aisladas de animales de compañía, aves de corral destinadas a consumo y en ganado bovino, por lo que algunos autores consideran que dicha plataforma debería ser considerada como un plásmido epidémico (Palmeira JD, et al., 2020).

Por otro lado, en dos de los genomas analizados se detectó la presencia de *bla*_{CTX-M-14}; este es una variante de *bla*_{CTX-M-9} (un cambio aminoacídico en el residuo 231), y fue descrito por primera vez en Europa en el año 2001, a partir de aislamientos clínicos obtenidos de un paciente de origen asiático (Poirel L, et al., 2001). Si bien inicialmente esta β -lactamasa recibió la designación de CTX-M-18, actualmente en la Base de Datos de β -lactamasas (<http://blddb.eu/BLDB.php?prot=A#CTX-M>), se aclara que CTX-M-14 y 18 son la misma enzima, pudiéndose emplear indistintamente cualquiera de las designaciones.

Como se mencionó previamente, *bla*_{CTX-M-14} fue hallado en dos aislamientos, el primero se trató de hecho, del primer reporte en Sudamérica de una cepa de *S. Enteritidis* portando el gen *bla*_{CTX-M-14}; dicha cepa fue obtenida en 2011 de un coprocultivo (Bado I, et al., 2012). En este sentido, dicho gen se encontró codificado en un plásmido de tipo IncI1, secuenciotipo pST80, con un tamaño de unos 105.8 Kb. El entorno de *bla*_{CTX-M-14} fue igual al descrito inicialmente por Chanawong y cols. (Chanawong A, et al., 2002), es decir flanqueado corriente arriba por el tándem *ISEcp1-IS10R*, y corriente abajo por *IS903*; este bloque, a su vez, estaba precedido por una copia de *IS26* inserta en la resolvasa de un transposón Tn3, y luego por el gen *bla*_{TEM-1} de dicho transposón, y se continuaba por los genes de resistencia a macrólidos *ermB-ermBL* flanqueados por dos copias en orientación divergente de *IS26*. De manera interesante, esta plataforma IncI1/pST80/*bla*_{TEM-1}/*bla*_{CTX-M-14}/*ermB* fue detectada nuevamente en nuestro país, pero en un aislamiento clínico de *E. coli* (Di Pilato V, et al., 2019). El alineamiento nucleotídico de ambos plásmidos (pUY050 [esta tesis] vs pUR-EC07 [Di Pilato et al]) mostró que ambos eran prácticamente idénticos salvo por alguna inversión en la región del *shufflon*, y por la región de resistencia. Con relación a esta última, el plásmido pUR-EC07 presentó una doble inversión de ADN, por un lado, la región comprendida entre Δ *tnpR* e *IS903*, y, por otra parte, la región comprendida por los genes *ermB/BL* y un ORF putativo (Fig. 31). Asimismo, si bien en pUR-EC07 los autores encontraron una copia trunca de *ISEcp1*, en el plásmido pUY050 dicha secuencia de inserción presentaba una cobertura del 100% cuando se comparó contra la base de datos de tales EGM (<https://isfinder.biotoul.fr/>).

En otro orden, el segundo alelo de *bla*_{CTX-M-14} hallado, fue en una cepa de *S. Typhimurium* aislada a partir de un coprocultivo en el año 2012. A diferencia de lo mencionado en el párrafo anterior, este segundo alelo estaba codificado en un plásmido de tipo IncN, de aproximadamente 62 Kb de largo. El entorno genético de *bla*_{CTX-M-14} junto a otros genes de resistencia presentes en este último plásmido se describe en detalle, en la sección 7.6.1.

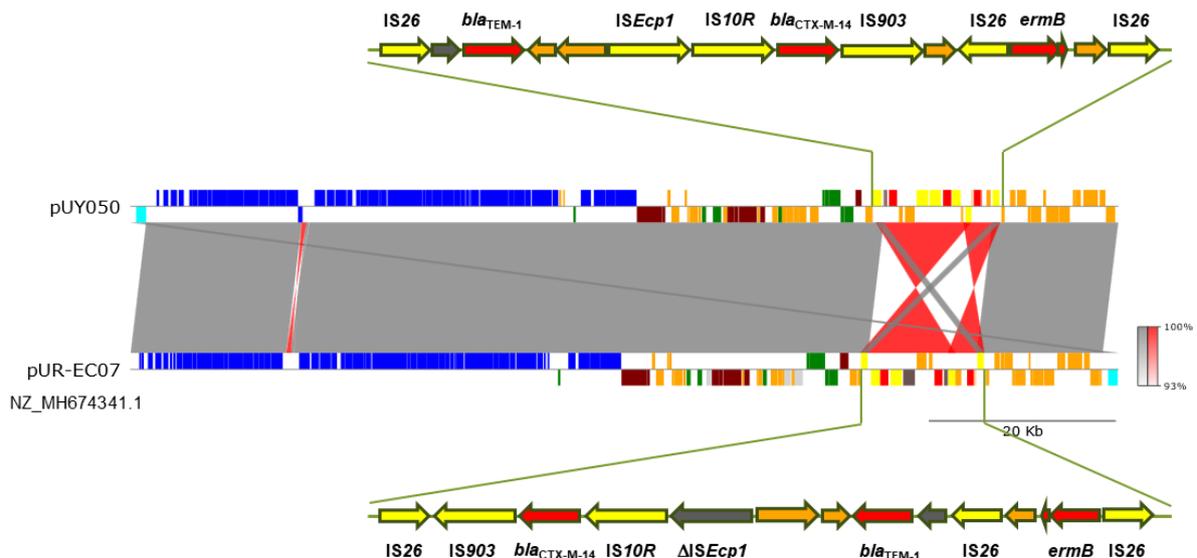


Figura 31. Comparación de entornos genéticos de *bla*_{CTX-M-14} y de los plásmidos IncI1 que los portaban, detectados en Uruguay (pUY050, descrito en la presente tesis vs. pUR-EC07, descrito por Di Pilato y cols.). En los diagramas superior e inferior, las flechas naranjas representan ORFs putativos, la flecha en gris oscuro indica genes truncos/pseudogenes, las flechas amarillas representan las distintas secuencias de inserción, y las flechas rojas representan a genes de resistencia antibiótica. En el diagrama central, los rectángulos azules representan genes de transferencia plasmídica; los rectángulos amarillos representan transposones/secuencias de inserción; los rectángulos verdes representan genes asociados a la estabilidad del plásmido; los rectángulos marrones indican genes asociados a la segregación plasmídica, y los bloques celestes representan genes asociados a la replicación plasmídica. Los rectángulos rojos representan genes RAM, y los bloques naranjas, genes varios y ORFs putativos. Los bloques en gris marcan regiones de homología (identidad $\geq 99\%$), y las líneas rojas indican inversiones de ADN.

La tercera variante de CTX-M detectada en los genomas de *S. enterica* correspondió a *bla*_{CTX-M-15}. Esta variante alélica, reportada por primera vez en India en el año 2001, deriva del gen *bla*_{CTX-M-3}; desde el punto de vista de la secuencia aminoacídica, ambas variantes difieren únicamente en la posición 238, en el cual CTX-M-15 presentaría un residuo de glicina en lugar ác. glutámico. (Karim A, et al., 2001). Desde entonces el gen que codifica para esta enzima se ha diseminado globalmente (atestiguado por la existencia de más de 2.500

publicaciones) y ha sido encontrado en muestras de origen humano, en animales de producción (Pehlivanoglu S, et al., 2016; Mechesso A, et al., 2022), animales silvestres (Guenther S, et al., 2010; Manageiro V, et al., 2015), y en muestras ambientales (Falgenhauer L, et al., 2021). En nuestro país *bla*_{CTX-M-15}, ha sido reportado en varias ocasiones y es la β -lactamasa más frecuentemente reportada en aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Bado I, et al., 2016); asimismo, en el plano local también hemos encontrado dicho gen en cepas de *E. coli* aisladas de materia fecal de ganado bovino y porcino (Coppola N, et al., 2020), así como en Enterobacterales (*E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*) aislados de pollitos de un día, importados desde el Brasil (Coppola N, et al., 2022).

En la presente tesis *bla*_{CTX-M-15} se encontró codificada en el genoma de un aislamiento de *S. Typhimurium* recuperada del coprocultivo de un paciente de 6 años. En tal sentido, este gen estaba inserto, junto a otros 18 genes RAM, en una isla de resistencia de unos 56 Kb, localizada a su vez en un plásmido de 315 Kb, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2A/HI2 (designado pUY192_H). La descripción detallada de dicha isla de resistencia, así como del plásmido en el cual estaba codificada, se brinda en la sección 7.6.3.

7.4.2.3 β -lactamasas de clase B

Durante la presente tesis recibimos un aislamiento de *S. Enteritidis* obtenido del urocultivo de un paciente con antecedente de hospitalización prolongada previa por COVID-19; el estudio de la susceptibilidad a los antibióticos mostró que dicho aislamiento presentaba un perfil de resistencia compatible con la producción de carbapenemasas de clase B. Posteriormente, el análisis del genoma de esta cepa mostró, entre otros genes RAM, la presencia de *bla*_{NDM-1}. Dentro de las distintas metalo- β -lactamasas, las enzimas de tipo NDM se han destacado por su rápida y amplia diseminación a nivel mundial (Dortet L, et al., 2014), habiéndose reportado en más de 90 países, incluyendo a Uruguay (Wu W, et al., 2019); en este sentido, NDM-1 ha demostrado ser la carbapenemasa más frecuentemente detectada en nuestro país (Papa-Ezdra R, et al., 2024). De manera similar a lo acontecido con mecanismos de resistencia,

además de haber sido detectada en Enterobacterales de origen clínico, diversos alelos de NDM también han sido en aislamientos de origen ambiental (Sekizuka T, et al., 2019), de animales silvestres, mascotas, ganado (Köck R, et al., 2018) e incluso en aislamientos de origen alimentario (Briet A, et al., 2018). Por otra parte, desde que fue descrita por primera vez, los distintos alelos de *bla*_{NDM} se han asociado a diversas plataformas genéticas; así, solo dentro del orden Enterobacterales estos genes han sido encontrados en plásmidos pertenecientes al menos a 20 grupos de incompatibilidad diferentes, principalmente, en plásmidos de tipo IncX3, IncFII e IncC (Wu W, et al., 2019). En tal sentido, el gen *bla*_{NDM-1} encontrado en el genoma de *S. Enteritidis*, en la presente tesis, estaba codificado en un integrón complejo de clase 1, junto a otros genes RAM, inserto a su vez plásmido conjugativo de tipo IncC de aproximadamente 168 Kb (designado como pUY193_C). Dicho integrón complejo y el plásmido pUY193_C se describen en detalle en la sección 7.6.4.

7.4.2.4 β -lactamasas de clase C

Con relación a las β -lactamasas de tipo AmpC, en cuatro genomas se detectó la presencia del gen *bla*_{CMY-2} que codifica para una cefamicinasa con actividad hidrolítica sobre cefalosporinas, oximino-cefalosporinas y aztreonam. Estos genomas correspondían a cuatro cepas de *S. Typhimurium* aisladas de coprocultivos; dos de estas cepas fueron obtenidas de pacientes pediátricos en distintos meses del año 2009, y las dos restantes fueron recuperadas en el año 2013, provenientes de pacientes en Montevideo y Rocha.

El gen *bla*_{CMY-2} fue detectado por primera vez en 1990 en un aislamiento de *K. pneumoniae*; estudios filogenéticos sugieren que dicho gen, junto a otros derivados de éste, descenderían del gen *ampC* presente en el cromosoma de *C. freundii* (Barlow M, et al., 2002). Actualmente, *bla*_{CMY-2} es el gen codificante de β -lactamasas de clase C más predominante a nivel mundial (Drijver EPMD, et al., 2020); la diseminación de este gen ha sido promovida por su asociación a plásmidos conjugativos, principalmente pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncC, IncI, IncF e incK (Carattolli A, 2009; Dolejska M, et al., 2018), habiéndose reportado

también la movilización de este gen en plásmidos de tipo ColE1 (Fang LX, et al., 2018). Parece existir una asociación entre plásmidos IncC portadores de *bla*_{CMY-2} y aislamientos de *E. coli* y serovares de *Salmonella* frecuentes en muestras de origen bovino; del mismo modo, plásmidos IncK portadores de *bla*_{CMY-2} han sido encontrados en cepas de *E. coli* aisladas de aves acuáticas y córvidos en Europa y América del Norte (Dolejska M, et al., 2018). Por otra parte, la mayoría de los plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} descritos hasta la fecha pertenecen al grupo de incompatibilidad IncI1, y en particular al secuenciotipo pST12. Dado el papel que ha jugado este tipo de plásmidos en la diseminación global de este gen de resistencia, tanto en humanos como en animales, habría adquirido el estatus de plásmido epidémico (Carattoli A, et al., 2021). En este sentido, en los cuatro genomas de *S. Typhimurium* de esta tesis en los cuales se encontró *bla*_{CMY-2}, dicho gen estaba codificado en plásmidos IncI1, del secuenciotipo pST12. En los cuatro plásmidos el entorno genético de *bla*_{CMY-2} era idéntico; así este gen estaba flanqueado corriente arriba por los genes *sugE* y *b1c*, que codifican para una proteína de resistencia a productos de amonio cuaternario, y para una proteína de la familia de las lipocalinas, respectivamente; a su vez, corriente abajo de *bla*_{CMY-2} se hallaba el EGM *ISEcp1*, encargado de movilizar los genes anteriormente mencionados (Fig. 32).

Este arreglo genético se encontraba invariablemente inserto entre los genes *cia* (que codifica para colicina-Ia) y *yagA* (proteína hipotética), flanqueado por los repetidos directos 5'-TGGGT-3'; asimismo dicho arreglo también se encuentra muy conservado y está ampliamente distribuido a nivel mundial, habiendo sido reportado en el continente americano, Asia y Europa (da Silva KC, et al., 2017). Del mismo modo, los plásmidos Inc1-pST12 portadores de *bla*_{CMY-2} hallados en este trabajo, presentan un alto grado de similitud entre sí. Este hecho está en línea con otros trabajos, en los cuales este tipo de plásmidos, provenientes de Enterobacterias de origen humano o animal, muestran un elevado nivel de similitud a nivel de su secuencia nucleotídica (Drijver EPMD, et al., 2020). Esto sugiere que la plataforma IncI-pST12-*bla*_{CMY-2} es exitosa, desde un punto de vista evolutivo, reafirmando el estatus de plásmido epidémico sugerido por Carattoli y cols.

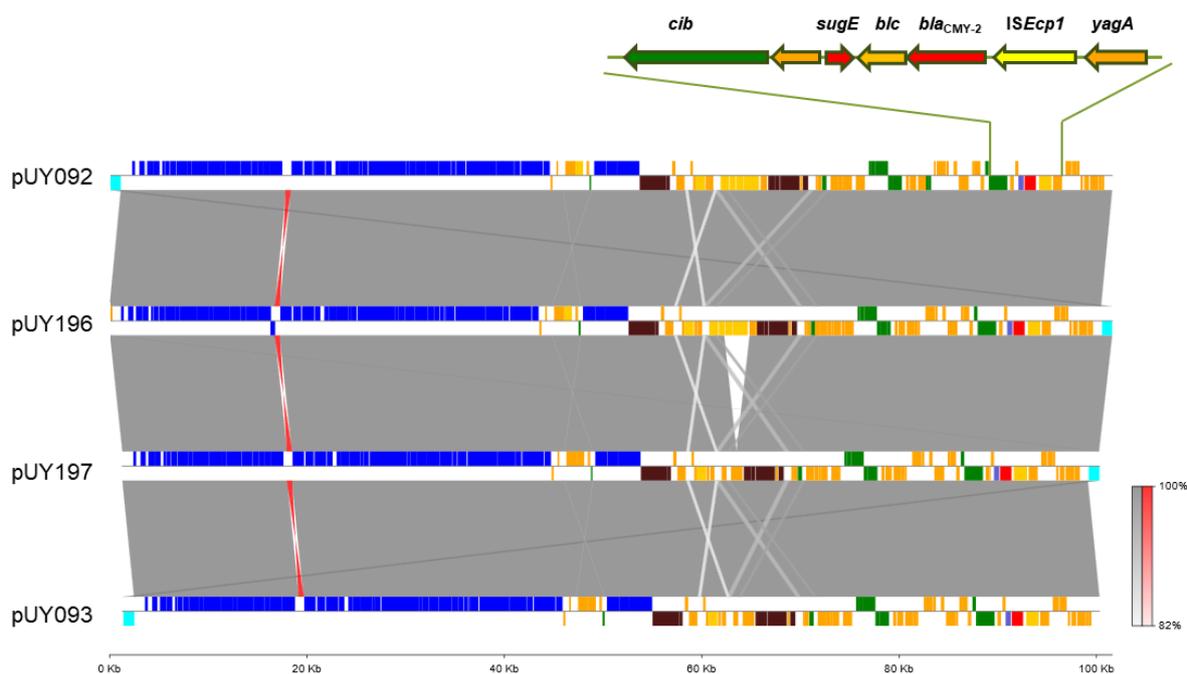


Figura 32. Comparación del entorno genético de *bla*_{CMY-2} y de los plásmidos IncI1 en donde fueron hallados. En el diagrama superior, las flechas naranjas representan genes hipotéticos o con función conocida; la flecha en verde indica un gen de estabilidad plasmídica; la flecha amarilla representa una secuencia de inserción, y las flechas rojas representan a genes de resistencia antibiótica. En el diagrama inferior, los rectángulos azules representan genes de transferencia plasmídica; los rectángulos amarillos representan transposones/secuencias de inserción; los rectángulos verdes representan genes asociados a la estabilidad del plásmido; los rectángulos marrones indican genes asociados a la segregación plasmídica, y los bloques celestes representan genes asociados a la replicación plasmídica. Los rectángulos rojos representan genes RAM, y los bloques naranjas, genes varios y ORFs putativos. Los bloques en gris marcan regiones de homología (identidad \geq 99%), y las líneas rojas indican inversiones de ADN.

7.4.2.5 β -lactamasas de clase D

Con relación a las β -lactamasas de clase D, en el presente trabajo se detectó la presencia de ocho genes que codificaban para enzimas pertenecientes a la familia OXA; específicamente se hallaron los genes *bla*_{OXA-1} (n=1), *bla*_{OXA-4} (n=3) y *bla*_{OXA-9} (n=4). Así, *bla*_{OXA-1} fue hallado en un aislamiento de *S. Typhimurium* recuperada a partir de un coprocultivo el año 2016, este gen estaba inmerso en una isla de resistencia de unos 56 Kb codificada en el plásmido pUY192_H; el entorno genético de dicho gen se describe en detalle en la sección 7.6.3.

En otro orden, el gen *bla*_{OXA-1} fue descrito por primera vez en el Reino Unido; por su parte la enzima OXA-1 es capaz de hidrolizar eficientemente amino- y ureido penicilinas, y con menor

eficacia es capaz de hidrolizar cefalosporinas de estrecho espectro de actividad, siendo capaz de brindar susceptibilidad disminuida frente cefotaxima y a cefepime. Con relación a su entorno, *bla*_{OXA-1} suele encontrarse en forma de gen *cassette* en integrones de clase 1, insertos a su vez en plásmidos y en cromosomas de diversas especies bacterianas (Yoon EJ, et al., 2021); además, de manera similar al alelo encontrado en la presente tesis, *bla*_{OXA-1} ha sido frecuentemente encontrado asociado a la BLEE CTX-M-15 en Enterobacterias de diversos orígenes geográficos (Poirel L, et al., 2010).

Por otro lado, el alelo *bla*_{OXA-4} se encontró en el genoma de tres aislamientos de *S. Typhimurium* recuperados a partir de coprocultivos, dos de ellos en el año 1978 y el restante en el año 1981. Este resulta ser un dato interesante ya que las primeras publicaciones describiendo la existencia de esta variante corresponden al año 1986, tanto en enterobacterias como en *P. aeruginosa* (Medeiros AA, et al., 1986; Philipon AM, et al., 1986); en este sentido las muestras de enterobacterias provenían de Brasil y habían sido aisladas en 1979, mientras que las muestras de *P. aeruginosa* eran de origen francés y habían sido recuperadas en el año 1977. Esto sugiere que *bla*_{OXA-4} ya se encontraba ampliamente distribuida a nivel mundial desde mucho antes. Desde el punto de vista enzimático, OXA-4 pertenece a la subfamilia de OXA-1-like, compartiendo una identidad aminoacídica superior a 91%, y posee además un perfil hidrolítico similar al de OXA-1 (Yoon EJ, et al., 2021). De manera similar a lo descrito por otros autores (Antunes NT, et al., 2014), en nuestros genomas analizados, *bla*_{OXA-4} se encontró formando parte de un integrón de clase 1, junto a los genes modificantes de aminoglucósidos *aadA2* y *aadB* (Fig. 33).

La búsqueda de arreglos genéticos similares en bases de datos arrojó un solo *hit* bastante similar, mientras que el resto comprendían solo regiones discretas de homología. En este sentido, el resultado más parecido correspondió a un plásmido de tipo IncF presente en un aislamiento de *Salmonella enterica* var. Hissar, en Rusia. Desafortunadamente, los *contigs* de los genomas en los cuales se detectó a *bla*_{OXA-4} se encontraban muy fragmentados,

sumado a la presencia en estos genomas de múltiples grupos de incompatibilidad plasmídica, imposibilitó determinar en qué tipo de plásmido estaba presente este gen.

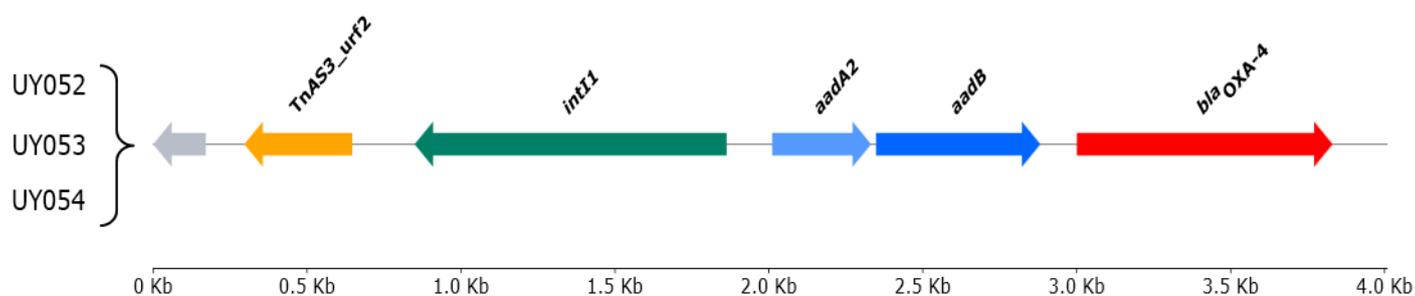


Figura 33. Entorno genético de los alelos *bla*_{OXA-4} (flecha roja) presentes en los aislamientos UY052, UY053 y UY054 de *S. Typhimurium* (indicado por la llave a la izquierda del mapa). Las flechas en tonos de azul indican genes codificantes para enzimas modificadoras de aminoglucósidos. La flecha verde representa al gen codificante para la integrasa. La flecha amarilla corresponde a uno de los genes auxiliares del transposón TnAS3, mientras que la flecha gris representa un gen parcial. Los genomas en los que fue hallado

Finalmente, el gen *bla*_{OXA-9} fue encontrado en el genoma de cuatro aislamientos de *S. Derby*; los cuatro fueron recuperados a partir de coprocultivos durante el año 1984. Este gen codifica para una enzima que presenta propiedades distintas a la de otras variantes OXA; en tal sentido, OXA-9 es inhibible por ácido clavulánico y cloxacilina, pero no por NaCl, aunque desde el punto de vista de su perfil hidrolítico es considerada como una variante de espectro estrecho de sustratos (Poirel L, et al., 2010). Este gen fue identificado por primera vez en un plásmido presente en un aislamiento de *K. pneumoniae*, y formando parte de integrones de clase 1 en Enterobacterales recuperados en Europa (Poirel L, et al., 2010; Yoon EJ, et al., 2021). La presencia de *bla*_{OXA-9} en aislamientos de *Salmonella* también ha sido reportada; de este modo en nuestra región, este gen ha sido encontrado en Argentina en serovares como Typhimurium, Agona, Enteritidis, Orianenburg e Infantis (Orman BE, et al., 2002). Por otra parte, y como se mencionó previamente, en Uruguay *bla*_{OXA-9} fue encontrado en aislamientos clínicos de *S. Derby*; en tres de los cuatro aislamientos dicho gen estaba codificado en plásmidos IncI1, de secuenciotipos disímiles (pST272, pST31 y pST336); por otra parte, el

aislamiento restante no portaba un plásmido de tipo IncI1, y si bien presentaba diferentes replicones, dada la fragmentación de los *contigs* no fue posible asignar este gen de resistencia a un plásmido determinado. No obstante, el entorno genético “inmediato” de *bla*_{OXA-9} fue común a los cuatro aislamientos; así el mismo estaba inserto en un transposón designado Tn1331, junto a los genes *aac(6′)-Ib* y *ant(3′′)-Ia* (que conferirían resistencia a amikacina, kanamicina, estreptomycin y tobramicina), y también junto al gen de resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación, *bla*_{TEM-1} (Fig. 34); este último gen estaba precedido por una copia trunca del gen *tnpR*, también característico del Tn1331. Este transposón fue descrito por primera vez en el año 1993, y curiosamente presenta algunas características llamativas; por un lado, se asemeja al transposón Tn3, y, por otro lado, presenta secuencias semejantes a las encontradas en las regiones variables de integrones,

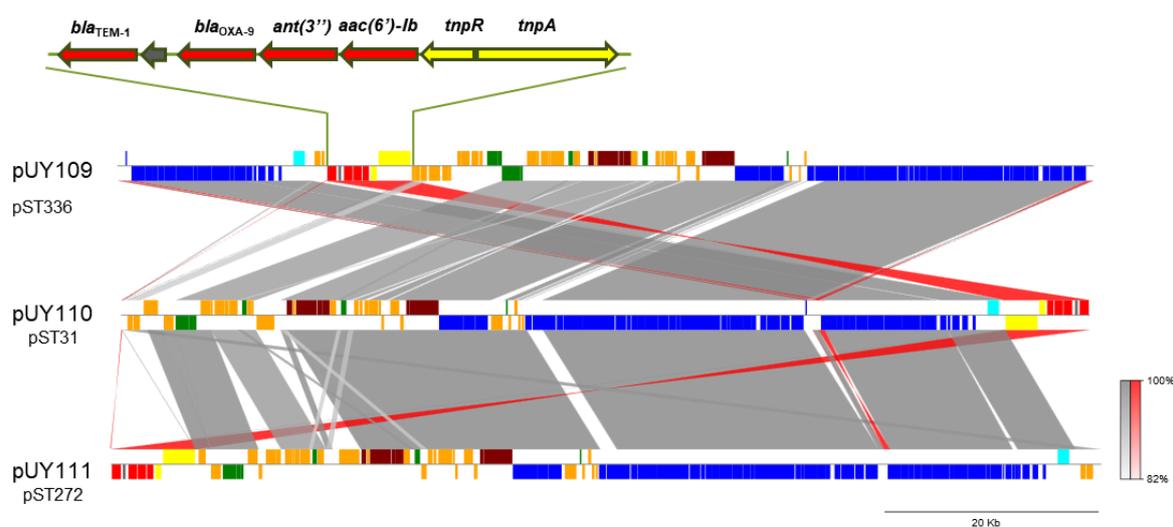


Figura 34. Comparación del entorno genético de *bla*_{OXA-9} y de los plásmidos IncI1 en donde fueron hallados. En el diagrama superior, las flechas amarillas corresponden a la transposasa y la resolvasa; las flechas rojas representan a los genes de resistencia antibiótica, y la flecha gris oscura representa un pseudogen. En el diagrama inferior, los rectángulos azules representan genes de transferencia plasmídica; los rectángulos amarillos representan transposones; los rectángulos verdes representan genes asociados a la estabilidad del plásmido; los rectángulos marrones indican genes asociados a la segregación plasmídica, y los bloques celestes representan genes asociados a la replicación plasmídica. Los rectángulos rojos representan genes RAM, y los bloques naranjas, genes varios y ORFs putativos. Los bloques en gris marcan regiones de homología (identidad $\geq 99\%$), y las líneas rojas indican inversiones de ADN

tales como los sitios *attI* y *attC* empleados para la integración y escisión de genes *cassette* (Tolmashy ME, et al., 1993).

7.4.3. Resistencia transferible a quinolonas

La presencia de genes transferibles de resistencia a quinolonas en *S. enterica* durante el periodo estudiado fue baja. Así, solo se encontraron 7 de estos genes presentes en 5/212 genomas, y todos en cepas aisladas después del año 2000. Por otra parte, podemos dividir a los genes encontrados según el mecanismo empleado para conferir protección frente a las quinolonas; en este sentido se detectaron genes que codifican para proteínas que enmascaran a las girasas entorpeciendo la unión al antibiótico, genes que codifican para enzimas modificantes del antibiótico, y genes que codifican para una bomba de eflujo capaz de extruir del citoplasma a las quinolonas (Fig. 35).

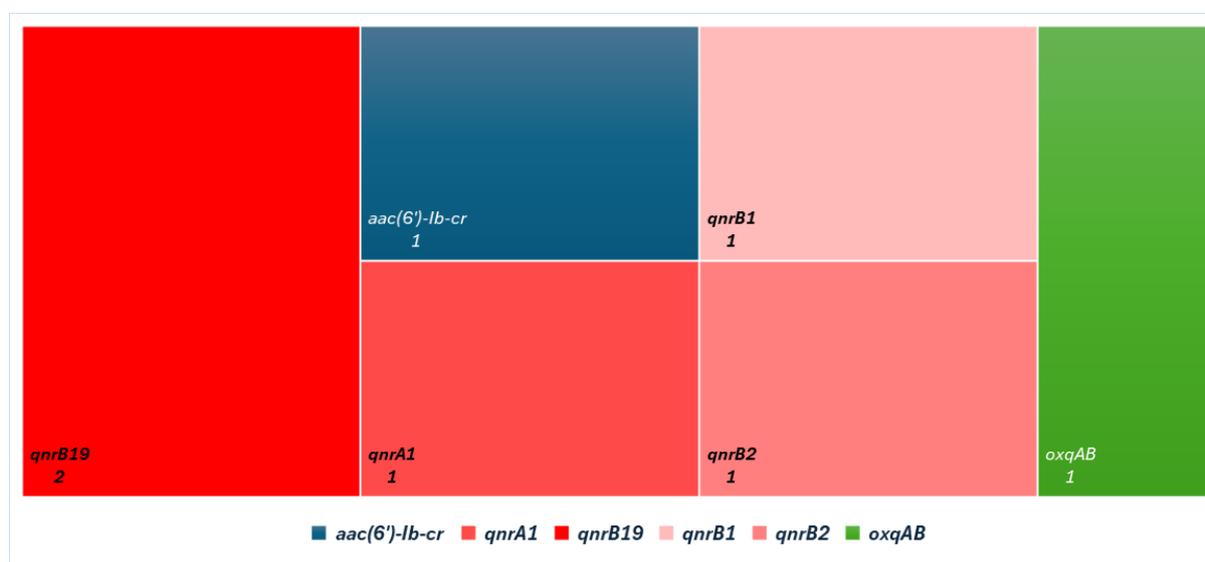


Figura 35. Gráfico jerárquico de los genes transferibles de resistencia a quinolonas. Cada uno de los genes encontrados aparece como rectángulos, con tamaños proporcionales a su representación en la muestra. El esquema de colores obedece al mecanismo empleado para conferir protección frente a las quinolonas. Así, aquellos en tonos de rojo funcionan mediante enmascaramiento del sitio blanco; en azul, mediante modificación enzimática del antibiótico y en verde, mediante extrusión activa del citoplasma bacteriano. Los números debajo de cada gen indican la cantidad de veces que fueron hallados.

7.4.3.1. Genes de enmascaramiento del sitio blanco

La presencia de genes *qnr* fue detectada en cinco de los genomas analizados; uno de ellos pertenecía a la familia *qnrA* y los restantes cuatro correspondían a alelos de la familia *qnrB*. Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de proteínas de pentapéptidos repetidos (PRP); estas proteínas forman dímeros y adoptan un plegamiento que genera una molécula

alargada. En ensayos in vitro se ha observado que las proteínas Qnr compiten con las quinolonas por las girasas bacterianas, mimetizando el ADN bacteriano en la región determinante de resistencia a quinolonas en las topoisomerasas (Jacoby GA, et al., 2015). Asimismo, en función del porcentaje de identidad (<70%) los distintos alelos *qnr* se han dividido, hasta el momento, en 7 familias de genes transferibles (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrS* y *qnrVC*). En tal sentido, el alelo *qnrA1* encontrado en esta tesis, estaba presente en el genoma de una cepa multirresistente de *S. Enteritidis* aislada a partir de un urocultivo en el año 2022. Dicho gen estaba inserto en un integrón complejo de clase 1, corriente abajo de la segunda copia del elemento *ISCR1*; dicho integrón a su vez estaba codificado en un plásmido IncC de tipo 2 con tamaño de unos 168 Kb. La descripción detallada del entorno genético de *qnrA1*, y del plásmido en donde fue hallado se brinda en la sección 7.6.4.

Por otra parte, dentro de la familia *qnrB* se encontraron tres variantes. En orden ascendente, el primero de ellos, *qnrB1*, estaba presente en el plásmido pUY192_H (IncHI2A/HI2) designado como pUY192_H, portado por una cepa de *S. Typhimurium* aislada en el año 2016. En este sentido, *qnrB1*, estaba inserto junto a otros genes RAM en una extensa isla de resistencia, flanqueado corriente arriba por una copia de *IS26* y un gen hipotético, y corriente abajo por un gen trunco y por una copia de *IS3000*. De manera similar a *qnrA1*, la descripción detallada del entorno genético y del plásmido se brinda más adelante (ver sección 7.6.3).

El segundo alelo detectado fue *qnrB2*; este gen estaba inserto en un integrón complejo de clase 1 codificado en un plásmido de tipo IncN designado como pUY094_N (ver sección 7.6.1), presente en una cepa de *S. Typhimurium* aislada en el año 2012. De manera interesante, corriente abajo del elemento *ISCR1*, se encontraba el gen de susceptibilidad a péptidos antimicrobianos *sapA*, un gen hipotético, luego los genes *qnrB2* y *pspF* (proteína de shock fágico), y finalmente estaba el extremo 3'-CS del integrón (genes *qacED1* y *sul1*). Este entorno genético sugiere que el posible origen de *qnrB2* presente en este integrón sea algún miembro del complejo *C. freundii*, ya que dicho gen se encuentra codificado en el cromosoma

de los integrantes del mencionado complejo, precisamente entre los genes *sapA* y *pspF* (Jacoby GA, et al., 2011; Saga T, et al., 2013).

Por último, el tercer alelo correspondió al gen *qnrB19*; este fue hallado en el genoma de dos aislamientos, uno de *S. Enteritidis* (de origen clínico) y el otro de *S. Typhimurium* (de origen aviar). En ambos casos, *qnrB19* estaría contenido en plásmidos movilizables de unos 2800 pb, flanqueado corriente arriba por el gen *pspF* y corriente abajo por un gen hipotético, designados pUY091_Col y pUY172_Col (Fig. 36). La búsqueda de posibles replicones en ambos plásmidos indicó que éstos pertenecían al grupo Col(pHAD28), designación correspondiente al plásmido pHAD28, descrito en Alemania en el año 2016 (Fiegen U, et al., 2016). Dicho plásmido, identificado a partir de *Salmonella enterica* var. Hadar, de origen aviar, también portaba el gen *qnrB19* y resultó ser muy similar a pUY091_Col y pUY172_Col.

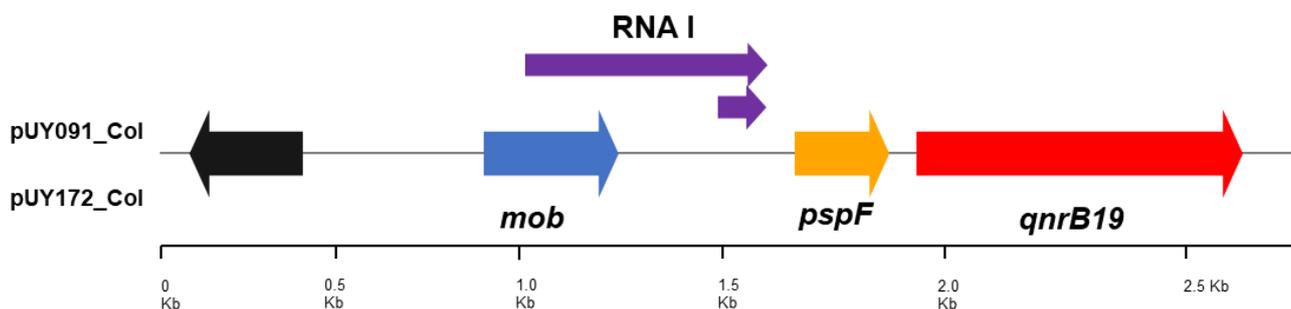


Figura 36. Entorno genético de los alelos *qnrB19* presentes en los genomas analizados. La flecha negra representa un gen hipotético; la flecha azul representa el gen que codifica para la proteína de replicación, y las flechas violetas representan a los ARN no codificantes que regulan la replicación de estos plásmidos (flecha grande ARNII y flecha chica ARNI).

De manera interesante, la cepa de *S. Typhimurium* UY172 fue aislada a partir de pollos en el año 2002, por otra parte, el primer reporte de alelos *qnr* en Uruguay corresponde al año 2010 (Bado I, et al., 2010), y más aún el primer reporte a nivel mundial de *qnrB19* fue en el año 2008 (Cattoir V, et al., 2008), en un aislamiento clínico de *E. coli* procedente de Colombia. Esto sugiere que dicho alelo se encontraba circulando entre distintos Enterobacteriales en nuestro continente desde hace mucho tiempo de forma “indetectable” en función a) la

protección de bajo nivel conferido frente a las quinolonas, y b) los puntos de corte existentes para esta familia de antibióticos en Enterobacterias a principios de la década del 2000.

7.4.3.2. Genes de enzimas modificantes de quinolonas

El único gen *aac(6')-Ib-cr* encontrado en nuestra colección de genomas, corresponde a un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* recuperado en el año 2016. La proteína codificada por este gen presenta dos sustituciones aminoacídicas (W102R y D179Y) respecto a AAC(6')-Ib; estos cambios redundan en la capacidad de modificar no solo aminoglucósidos como tobramicina, kanamicina y amikacina, sino que además agrega actividad acetilante sobre quinolonas con grupos piperazinilo no modificados como ciprofloxacina y norfloxacina (Rodríguez-Martínez JM, et al., 2016). Por otra parte, el gen *aac(6')-Ib-cr* ha sido frecuentemente detectado en forma de genes *cassette* en integrones de clase 1, o asociado a otros EGM como IS26 (Albornoz E, et al., 2017; Pan S, et al., 2023). En tal sentido, el alelo detectado en esta tesis se encontró como el primer gen *cassette* del integron de clase 1 que formaba parte de la isla de resistencia codificada en el plásmido pUY192_H (ver sección 7.6.3). En línea con lo reportado por otros autores (Bado I. et al., 2016; García-Fulgueiras et al., 2017), en este aislamiento también se detectó la asociación entre *aac(6')-Ib-cr* con *bla*_{CTX-M-15}, e incluso a un segundo gen transferible de resistencia a quinolonas (*qnrB1*).

7.4.3.3. Genes de extrusión activa

Dentro de las distintas bombas de eflujo transferibles con actividad frente a las quinolonas, se encontró en el genoma de una cepa de *S. Typhimurium* de origen clínico, la presencia de los genes *oqxAB*. Estos genes codifican para dos proteínas de 391 y 1050 aminoácidos, respectivamente que conforman un sistema de eflujo perteneciente a la familia de transportadores RND (Resistencia-Nodulación-División celular). Este sistema tiene un perfil amplio de especificidad de sustrato que abarca quinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina y ácido nalidíxico, y además a otros antibióticos como cloranfenicol y trimetoprima (Rodríguez-Martínez JM, et al., 2016). Se ha reportado que el entorno genético transferible

de *oqxAB* es el de un transposón designado Tn6010, en el cual los genes *oqxA*, *oqxB* y *oqxR* están flanqueados por dos copias de IS26 (Chan BK, et al., 2022); sin embargo, en nuestro caso no fue posible dilucidar el contexto genético ya que *oqxAB* estaban en un *contig* de pequeño tamaño y el resto del genoma ensamblado se encontraba muy fragmentado. No obstante, fue posible ver que corriente abajo de dichos genes se encontraba el gen regulador *oqxR*, mientras que corriente arriba se logró encontrar una porción del extremo 5' de la secuencia de inserción ISVsa5 (Fig. 37). No obstante, la presencia del replicón de plásmidos de tipo IncHI2 en el genoma de esta cepa de *S. Typhimurium* sugiere que *oqxAB* estarían codificados en este EGM; en tal sentido la existencia de estudios describiendo el papel de plásmidos IncHI2 en la diseminación de este mecanismo de resistencia a quinolonas entre aislamientos de *Salmonella*, avalarían nuestra teoría (Li L, et al., 2013; Wong MH, et al., 2016).

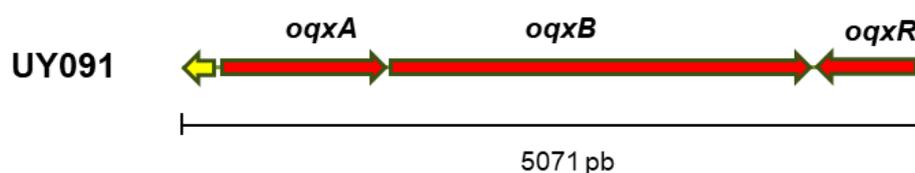


Figura 37. Esquema del *contig* del genoma de *S. Typhimurium* UY091 conteniendo los genes codificantes de OqxAB y su regulador en menos OqxR. La flecha amarilla representa el fragmento del extremo 5' de la transposasa de ISVsa5

7.4.4. Genes de resistencia a aminoglucósidos

En conjunto, los genes de resistencia a aminoglucósidos fueron los más frecuentemente detectados; en tal sentido, sin incluir al gen cromosómico *aac(6')-Iaa* (presente en todos los genomas analizados) se hallaron 56 genes distribuidos entre 26 aislamientos, con valores que oscilaban entre 1 y 6 determinantes de resistencia. En cuanto a su distribución temporal, estos genes de resistencia fueron hallados en genomas de cepas recuperadas en la década del 70, en adelante. Asimismo, si bien la mayoría de estos genes fueron encontrados en genomas de aislamientos clínicos, también fueron hallados a partir de aislamientos de origen animal y alimentario. Con relación al tipo de resistencia conferida, todos los genes

encontrados codificaban para enzimas modificadoras de aminoglucósidos (nucleotidiltransferasas, fosfotransferasas y acetiltransferasas) (Fig. 38).

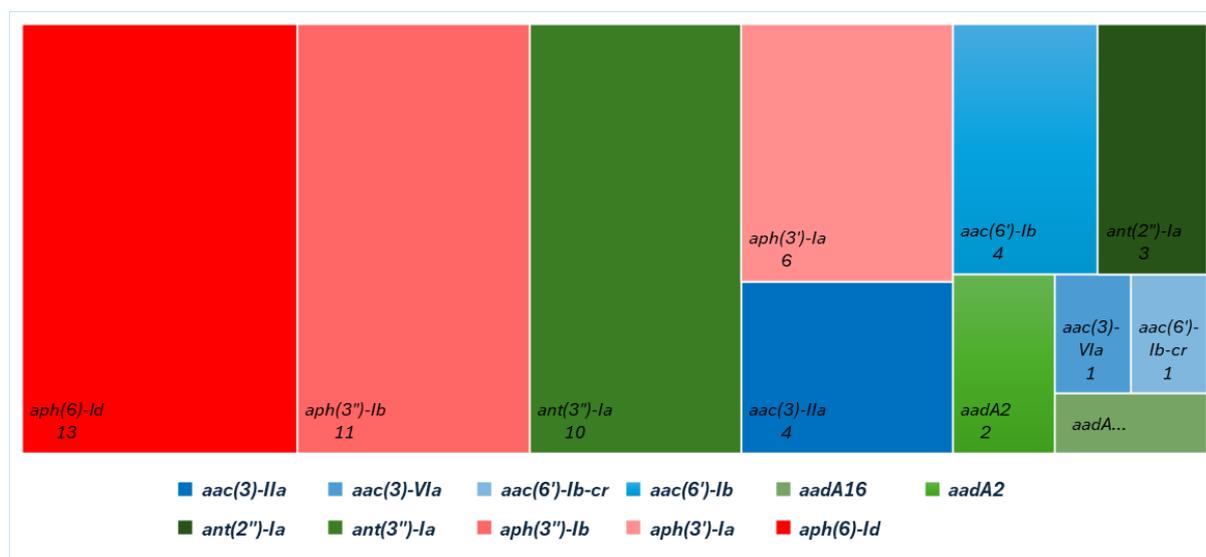


Figura 38. Gráfico jerárquico de los genes de resistencia a aminoglucósidos quinolonas. Cada gen está representado por rectángulos coloreados, donde el tamaño de estos es proporcional a su representación en la muestra (número debajo del gen). El esquema de colores obedece al mecanismo de modificación del antibiótico. Así, en tonos de rojo aparecen genes que codifican para fosfotransferasas; en tonos de verde, genes que codifican para nucleotidiltransferasas; en tonos de azul genes que codifican para acetiltransferasas.

7.4.4.1. Genes codificantes de aminoglucósido O-fosfotransferasas

Dentro de este grupo los genes encontrados fueron *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* y *aph(3')-Ia*, los dos primeros, también designados como *strA* y *strB*, respectivamente, son responsables por el fenotipo de resistencia a estreptomycin mientras que el último codifica para resistencia a kanamicina. Los genes *aph(6)-Id*, y *aph(3'')-Ib* fueron encontrados por primera vez en un plásmido de amplio rango de hospedadores (RSF1010), junto a otros genes como *repA*, *repC* y *sul2* (Ramirez MS, et al., 2010). En tal sentido, en los genomas analizados en la presente tesis, *aph(6)-Id*, y *aph(3'')-Ib* fueron encontrados siempre juntos, aunque en entornos genéticos variables (Fig. 39). En 11/13 genomas en los que fueron hallados, *sul2* fue encontrado corriente arriba; asimismo en seis de estos se encontró el tándem de resistencia

a tetraciclina *tet(A)-tet(R)*. De manera interesante, en dos genomas *aph(3'')-Ib* se encontraba interrumpido por la inserción del gen resistencia a trimetoprima *dfrA14*.

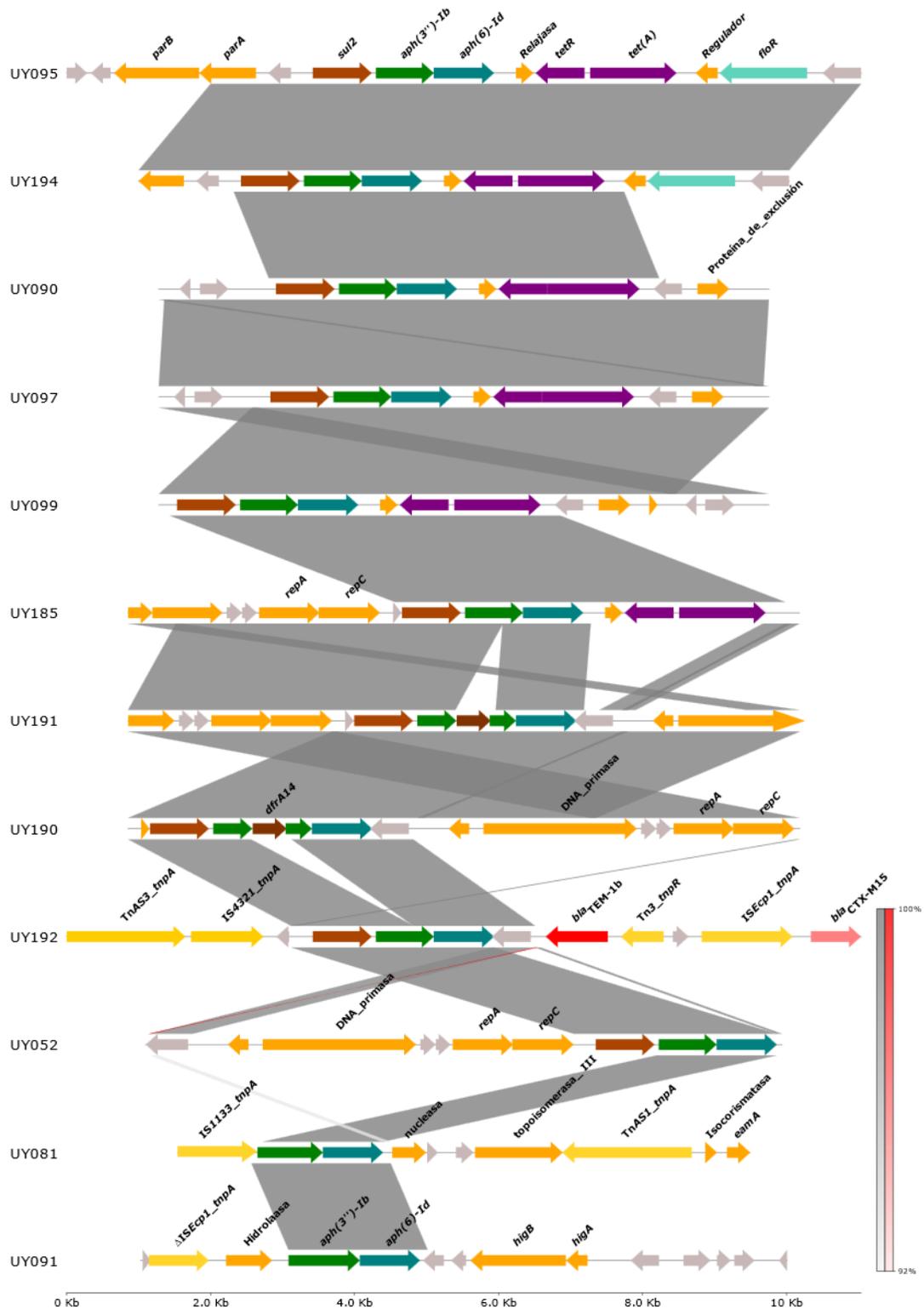


Figura 39. Entorno genético de los genes *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* presentes en los genomas analizados. Las flechas en gris claro representan genes hipotéticos y las flechas en naranja genes varios con función conocida. Los bloques en gris oscuro indican regiones de homología (identidad nucleotídica $\geq 99\%$).

Por otra parte, *aph(6)-Id*, y *aph(3'')-Ib* también fue hallado codificado en plásmidos de tipo IncH aunque insertos en diferentes loci y movilizados por distintas secuencias de inserción. Con relación al gen *aph(3')-Ia*, se trata de otro gen ampliamente distribuido entre distintas especies bacterianas y forma parte del transposón Tn903 (Ramirez MS, et al., 2010.). En nuestra colección de genomas, éste fue detectado en diferentes plásmidos inserto en transposones derivados del Tn21, aunque en dos ubicaciones distintas; por un lado, corriente arriba de genes de resistencia a mercurio, y, por otra parte, en otro plásmido fue hallado corriente abajo del operón de resistencia a mercurio y en orientación reversa, flanqueado a ambos lados por dos copias de IS26. Asimismo, en otros dos genomas *aph(3')-Ia* fue hallado en dos *contigs* casi idénticos de unos 6 Kb de largo, ubicado en uno de ellos corriente arriba de una copia de IS26 (Fig. 40).

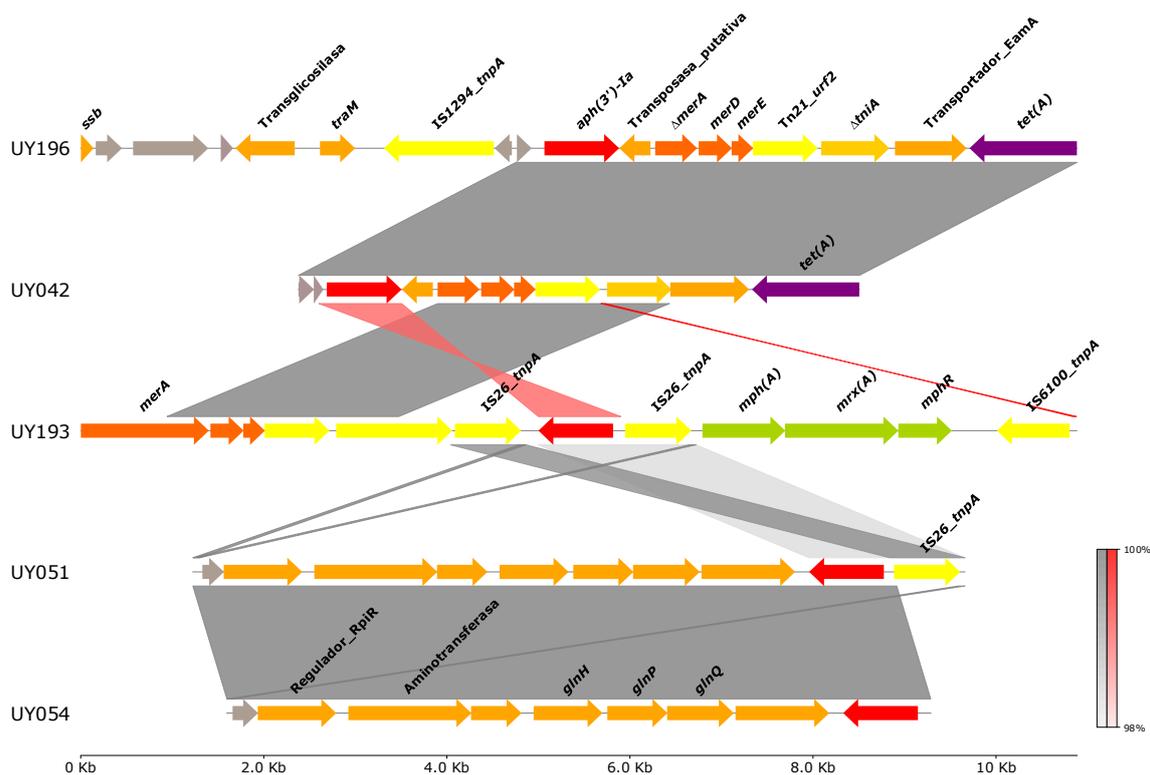


Figura 40. Entorno genético del gen *aph(3')-Ia* (flechas rojas). Las flechas grises indican genes hipotéticos, las naranjas claras genes de función conocida. En verde claro se marca el operón de resistencia a macrólidos *mph(A)*, y en naranja oscuro un operón trunco de resistencia a mercurio. Los bloques en gris oscuro representan regiones de homología (identidad nucleotídica ≥ 99), y los bloques en rojo indican inversiones de ADN.

7.4.4.2. Genes codificantes de aminoglucósido O-nucleotidiltransferasas

De las cinco clases de nucleotidiltransferasas descritas hasta la fecha, en la presente tesis se hallaron genes pertenecientes a las clases 2'', y 3''. Así, y en línea con lo descrito por otros autores (Ramírez MS et al., 2010), el gen *ant(2'')-Ia* (que codifica para resistencia a gentamicina, kanamicina y tobramicina) fue hallado como primer gen *cassette* en integrones de clase 1, que incluían entre otros, el gen *bla_{OXA-1}*. Asimismo, estos integrones estaban flanqueados corriente arriba por los distintos módulos que componen el transposón TnAS3 (transposasa, resolvasa y el gen accesorio *urf2*) (Fig. 41 A).

Por otra parte, dentro de la clase 3'', los alelos hallados fueron *ant(3'')-Ia*, *aadA2* y *aadA16* (el primero también puede ser encontrado como *aadA1*). Estos codifican para enzimas que confieren resistencia a estreptomicina, y usualmente se encuentran formando parte de EGMs como integrones y transposones, codificados a su vez en plásmidos. Así, de acuerdo con lo descrito por Ramírez MS y cols., el gen *ant(3'')-Ia* fue hallado formando parte de transposones de la familia Tn21, formando parte del transposón Tn1331 junto al gen *bla_{OXA-9}*, y también formando parte del transposón Tn7, que incluía a un integrón de clase 2 (Fig. 41 B). El gen *aadA2*, por su parte, fue hallado como gen *cassette* en integrones de clase 1 en dos genomas distintos. El primero de dichos integrones estaba flanqueado corriente arriba por el transposón TnAS2, y corriente abajo por el EGM *ISCR1*, y además de *aadA2* el otro gen *cassette* era *dfra12* que confería resistencia a trimetoprima. El segundo integrón tenía como único gen *cassette* al gen *aadA2*, y corriente abajo del extremo conservado 3'-CS se encontraba la secuencia de inserción *IS1326* (Fig. 41 C). Por último, el gen *aadA16* fue hallado en otro integrón de clase 1, presente en el plásmido pUY192_H (ver sección 7.6.3.).

7.4.4.3. Genes codificantes de aminoglucósido N-acetiltransferasas

Las diferentes enzimas de tipo AAC inactivan a los aminoglucósidos mediante la acetilación de dichos compuestos en las posiciones 1, 3, 2' o 6'. En tal sentido, entre los genomas estudiados se hallaron diez genes que codificaban para este tipo de enzimas.

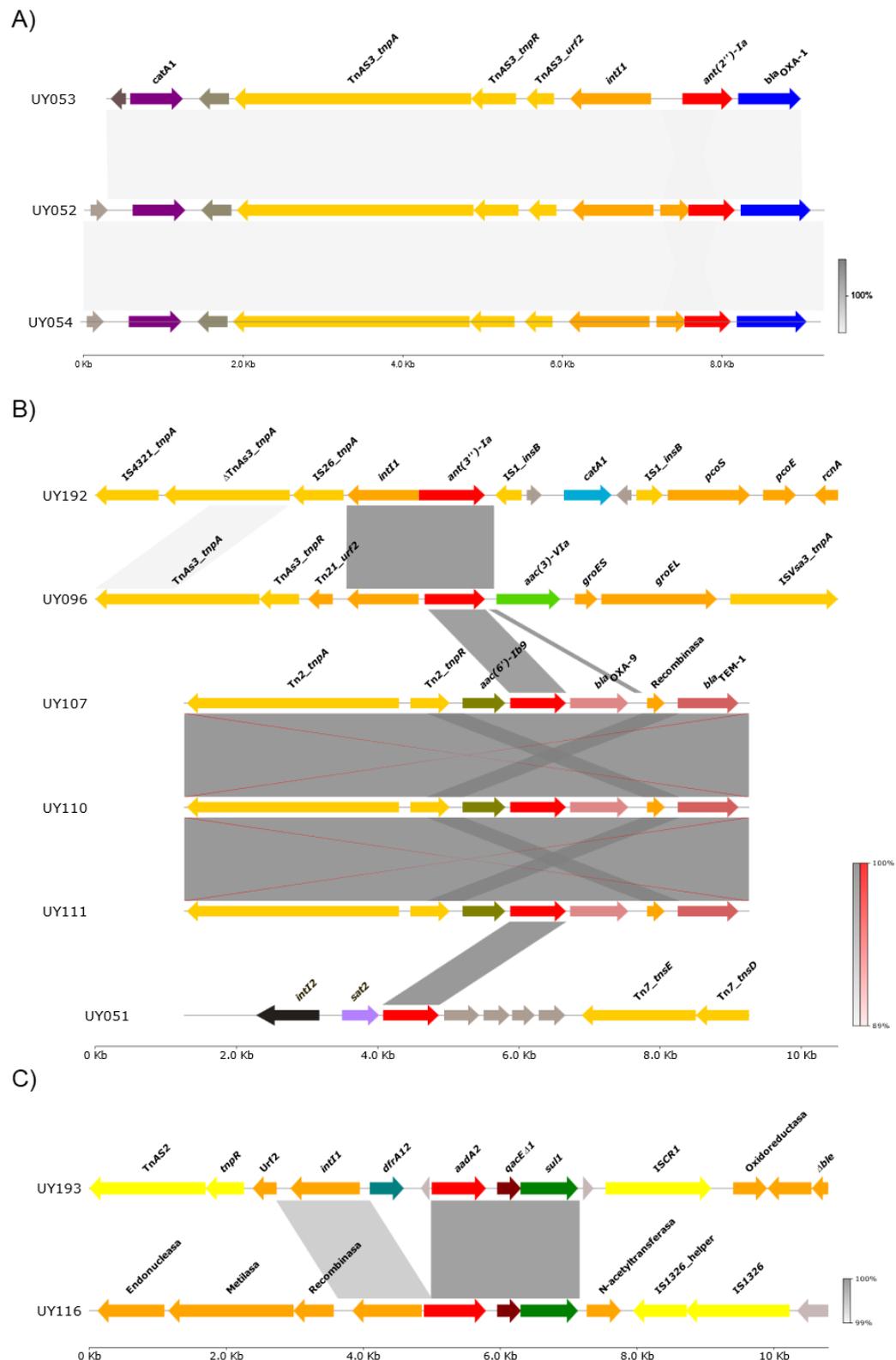


Figura 41. Entorno genético de los genes *ant(2'')-Ia* (panel A), *ant(3'')-Ia* (panel B) y *aadA2* (panel C). Las flechas grises representan genes hipotéticos, las flechas naranjas genes con función conocida, las flechas amarillas transposones/secuencias de inserción y la flecha negra un pseudogen (gen *int12*). Los bloques grises indican regiones de homología (identidad nucleotídica $\geq 99\%$).

Dentro de aquellas que acetilan en la posición 3, se hallaron los genes *aac(3)-IIa* (n=4) y *aac(3)-VIa* (n=1) [que codifican para AAC(3)-IIa y AAC(3)-VIa, respectivamente]. Los cuatro primeros, confieren resistencia a gentamicina y tobramicina, fueron hallados en genomas de *S. Typhimurium*, tres correspondientes a aislamientos clínicos y el restante obtenido de pollos. En este sentido, *aac(3)-IIa* fue hallado en dos tipos de entorno genético; así, este gen fue encontrado codificado en plásmidos de tipo IncFIA/FIB, flanqueado corriente arriba por el tándem IS15D-*bla*_{TEM-1}, y corriente abajo por un par de genes hipotéticos y la secuencia de inserción IS*Kpn11*. Asimismo, en otro de los genomas *aac(3)-IIa* estaba codificado en la isla resistencia presente en el plásmido de tipo IncHI2A/HI2 pUY192_H, flanqueado corriente arriba por IS26, y corriente abajo por un gen que codifica para un ATPasa putativa y luego por la secuencia de inserción IS*Kpn11*; el alineamiento de estos entornos, mostró que este último presenta cierta homología con el descrito para plásmidos IncFIA/FIB, lo que sugiere que el bloque IS15D/IS26-*aac(3)-IIa*-IS*Kpn11* funcionaría como una unidad transponible (Fig. 42 A). Por otra parte, el gen *aac(3)-VIa* fue detectado en un *contig* de unos 100 Kb, de una cepa de *S. Typhimurium* aislada a partir de pollo. Este fue hallado como gen *cassette* de un integrón de clase 1, flanqueado corriente arriba por ISCR1-*groEL-groS* y corriente abajo por un par de genes y el transposón TnAS3 (Fig. 42 B).

Con relación a aquellas enzimas acetilantes en la posición 6', si bien son las más frecuentes entre especies Gram negativas y Gram positivas (Ramírez MS, et al., 2010), en los genomas estudiados solo se encontraron los genes *aac(6')-Ib* (n=4) y su variante *aac(6')-Ib-cr* (n=1). Los primeros cuatro fueron hallados en genomas de *S. Derby* de origen clínico, asociados a un transposón derivado de Tn3, junto a otros genes de resistencia como *ant(3'')-Ia*, *bla*_{OXA-9} y *bla*_{TEM-1} (Fig. 42 C); el espectro de actividad de la enzima codificada por *aac(6')-Ib*, abarca amikacina y gentamicina C1a y C2, pero no gentamicina C1 (Ramírez MS, et al., 2010). Por otra parte, *aac(6')-Ib-cr* fue hallado en el plásmido pUY192_H, y el entorno ya fue descrito en la sección 7.4.3.2. Esta variante conserva el mismo perfil de actividad sobre los

aminoglucósidos, pero como ya se mencionó anteriormente agrega actividad acetilante sobre las fluoroquinolonas ciprofloxacina y norfloxacina.

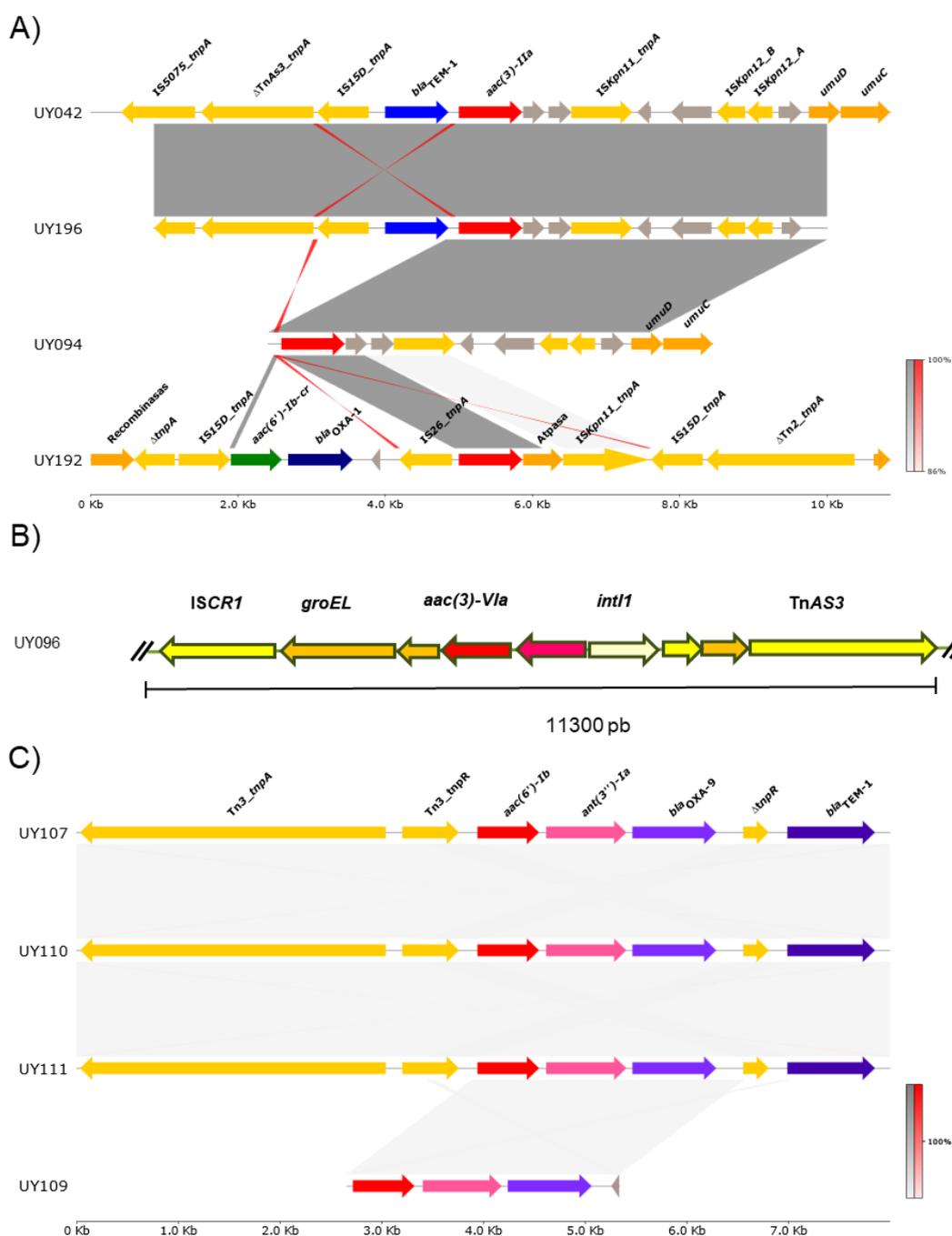


Figura 42. Entorno genético de los genes acetilantes de aminoglucósidos *aac(3)-IIa* (panel A), *aac(3)-Vla* (panel B) y *aac(6')-Ib* (panel C). Las flechas grises indican genes hipotéticos, las flechas naranjas genes varios con función conocida, y las flechas amarillas transposones/secuencias de inserción. Los bloques grises representan regiones de homología (identidad nucleotídica $\geq 99\%$), y las bandas rojas inversiones de ADN.

7.4.5. Genes de resistencia a fosfomicina

Entre todos los genomas analizados, el gen de resistencia a fosfomicina *fosA7* fue encontrado en 32 aislamientos. Dos de estos aislamientos correspondían al serovar Agona, ambos recuperados en 1976 a partir de coprocultivos; uno de los aislamientos pertenecía al serovar Heidelberg, obtenido a partir de pollos en el año 2000; por otra parte, los restantes 29 aislamientos correspondían al serovar Derby, recuperados entre los años 1983 y 2009 a partir de alimentos, coprocultivos, huevos y un hemocultivo.

El gen *fosA7* fue identificado por primera vez en el cromosoma de *S. Heidelberg*, flanqueado por dos genes hipotéticos (Rehman MA, et al., 2017). Asimismo, dichos autores también hallaron este gen en el cromosoma de otros serovares como Agona, Montevideo y Tennessee, aunque con distintos porcentajes de identidad nucleotídica. En este sentido, los alelos de *fosA7* hallados en la presente tesis, también se encontraban codificados en *contigs* cromosómicos en los serovares Agona, Derby y Heidelberg. Curiosamente, ninguno de los 14 genomas del serovar Montevideo incluidos en nuestro trabajo presentaban dicho gen. La presencia de *fosA7* en el genoma de *S. Derby* fue recientemente reportada, principalmente en cepas pertenecientes al secuenciotipo ST40. Este secuenciotipo ha sido vinculado a muestras de origen porcino, mientras que el ST71 estaría vinculado a muestras de origen aviar (Wang J, et al., 2021). De manera interesante, todos los genomas de *S. Derby* estudiados en esta tesis correspondían al ST40 (n=29), sin embargo, aproximadamente la mitad de estos eran de origen aviar (48%) y solo 4 eran de origen porcino (13.7%).

Por otra parte, y en línea con lo reportado por Rehman y cols., *fosA7* se encontraba flanqueado a ambos lados por dos genes hipotéticos, sin embargo, fue posible encontrar dos entornos genéticos distintos. Por una parte, en los genomas del serovar Agona, corriente arriba de *fosA7* se encontraron dos genes que codificaban para las subunidades S y R de un sistema de restricción-modificación y otro gen hipotético; por otro lado, en los genomas del serovar Derby y en el correspondiente al serovar Heidelberg, corriente arriba de *fosA7* se

encontró un gen codificante de una ARN helicasa y un gen codificante de una ADN helicasa (Fig. 43).

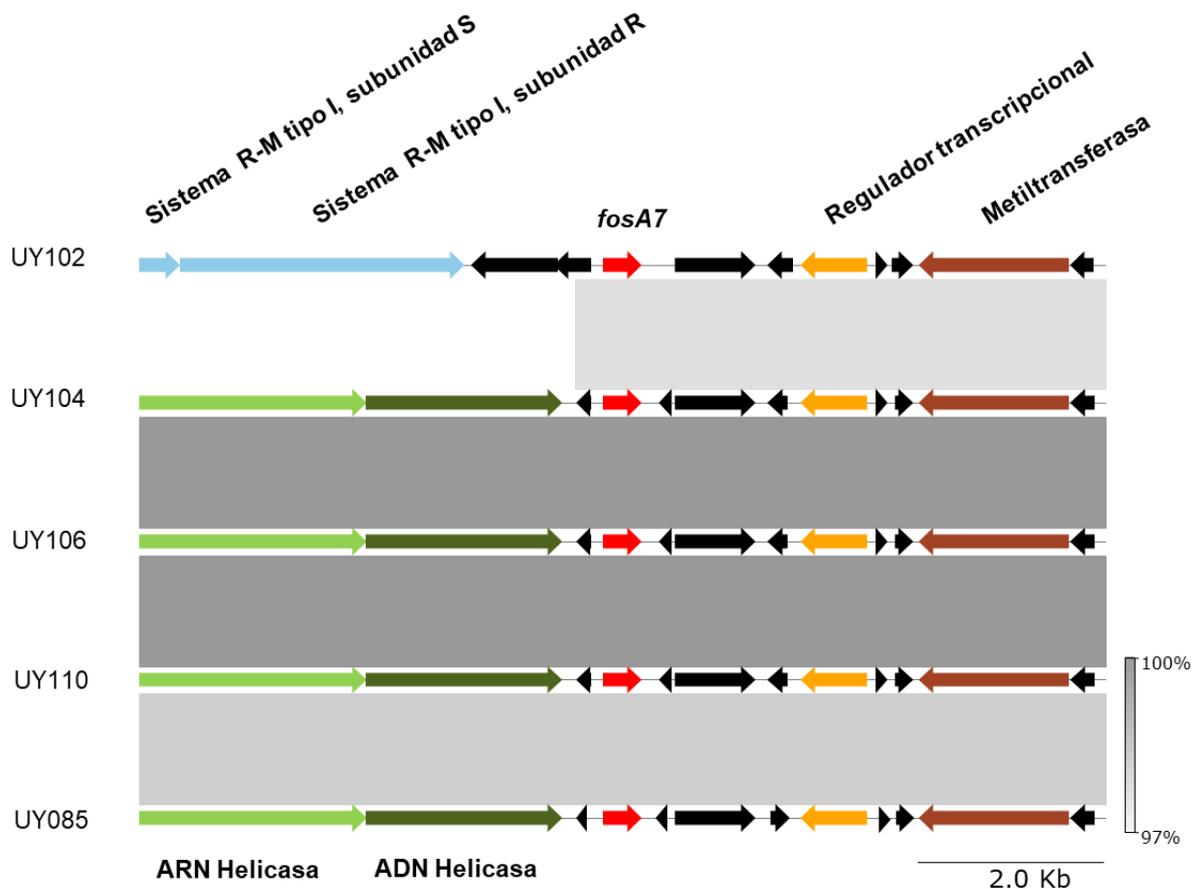


Figura 43. Entorno genético del gen *fosA7* en el serovar Agona (UY102), Derby (UY104, UY106, UY110) y Heidelberg (UY085). Las flechas negras representan genes hipotéticos. Para las restantes flechas, a igual color igual gen. Los bloques grises indican regiones de homología, con tonalidades más oscuras indicando un mayor porcentaje de identidad nucleotídica.

En otro aspecto, hasta la fecha se han detectado nueve alelos diferentes de *fosA7*, designados como *fosA7.1* a *fosA7.9*, y si bien estos alelos están localizados estrictamente en el cromosoma de *Salmonella*, algunos como *fosA7.5* y *fosA7.9* están vinculados a *E. coli* y *C. freundii*, respectivamente (Mattioni Marchetti V, et al., 2023). En tal sentido, se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes *fosA7* presentes en nuestra colección de genomas contra los distintos alelos depositados en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), empleando luego el resultado del alineamiento para la construcción del dendrograma correspondiente. Así, los genes *fosA7* encontrados en *S.*

Derby se agruparon con el alelo *fosA7.3*, los de *S. Agona* con el alelo *fosA7.2*, y el de *S. Heidelberg* con el alelo *fosA7.1* (Fig. 44).

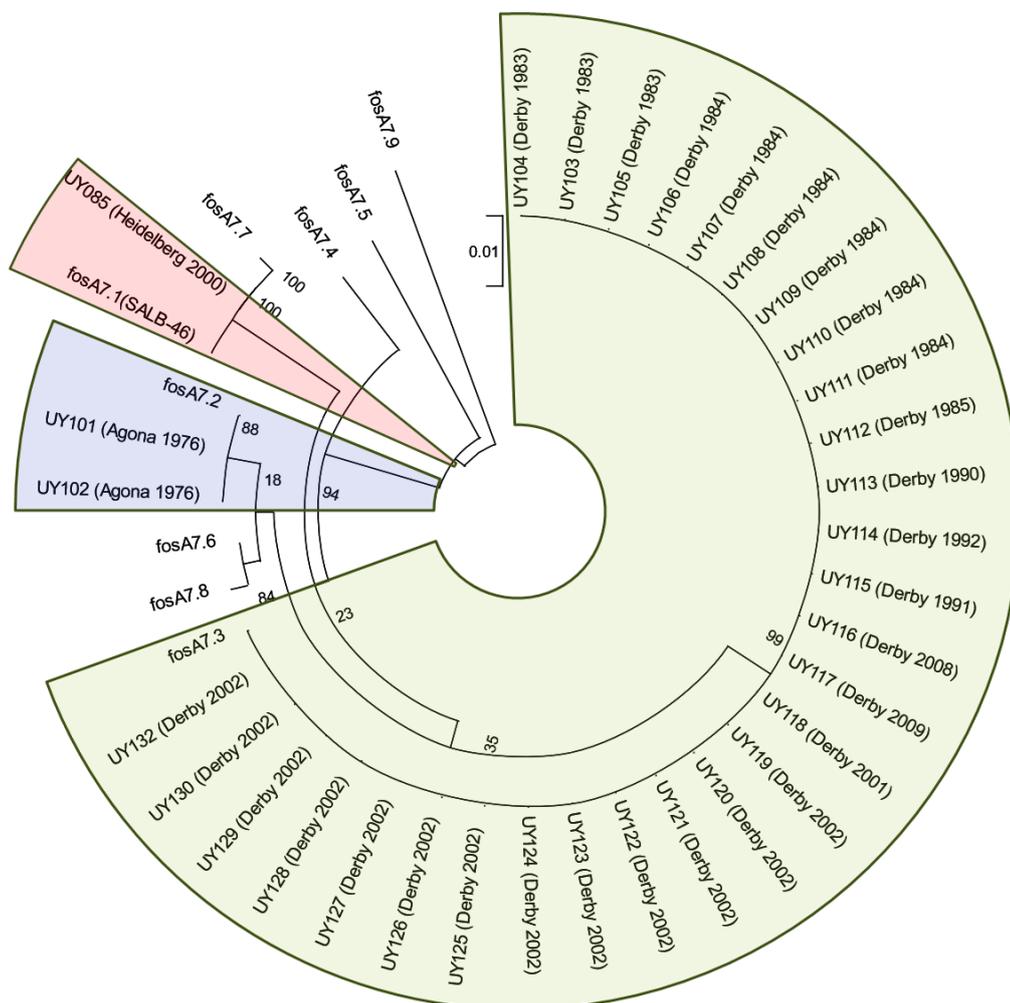


Figura 44. Dendrograma circular de los alelos *fosA7* presentes en la colección de genomas estudiados y del resto de variantes alélicas de dicho gen. La filogenia fue inferida mediante método Neighbor-Joining, con Bootstrap de 500 réplicas, mostrando el dendrograma óptimo. En verde se marca el agrupamiento de *fosA7.3* con el gen presente en *S. Derby*; en azul, se muestra el agrupamiento de *fosA7.2* con el gen presente en *S. Agona*; en rojo se muestra el agrupamiento de *fosA7.1* con el gen presente en *S. Heidelberg*. Imagen creada con el programa MEGA-XI.

En otro orden, diversos autores han reportado que la presencia de *fosA7* en el cromosoma de *Salmonella* no va acompañada de un fenotipo de resistencia a fosfomicina (Rehman MA, et al., 2017; Wang J, et al., 2021; Wang J et al., 2024). En tal sentido, el resultado de nuestros ensayos de CIM a fosfomicina están en línea con dichos autores; así, los valores oscilaron entre 1 $\mu\text{g/mL}$ y $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ (los resultados para todos los aislamientos con el gen *fosA7* se presentan en la tabla 6). En este sentido, cabría esperar que un gen que no confiere una

ventaja adaptativa a la célula que lo porta (en este caso resistencia frente a fosfomicina), hubiese acumulado mutaciones deletéreas. Así, se llevó a cabo un test-Z de selección basado en codones, para determinar si sobre el gen *fosA7*, presente en los genomas analizados, habría operado fenómenos de selección positiva, selección purificante (negativa), o si habrían estado sujetos a evolución neutra. Sorpresivamente, por un lado, el resultado del ensayo estadístico descartó la hipótesis nula (no hay diferencias entre el número de sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo, y el número de sustituciones sinónimas por sitio sinónimo), y por otra parte, se acepta la hipótesis de existencia de selección purificadora (selección en favor de mutaciones no sinónimas, no deletéreas). Este resultado sugiere que existe presión de selección para que *fosA7* no se pierda en la población, por lo que este gen podría estar participando en otras funciones no relacionadas a la resistencia antimicrobiana en *Salmonella* sp.

Tabla 6. Resultados del ensayo de concentración inhibitoria mínima a fosfomicina.

Cepa	Serovar	CIM*	Cepa	Serovar	CIM*	Cepa	Serovar	CIM*
UY085	Heidelberg	0.5	UY112	Derby	0.5	UY124	Derby	0.5
UY101	Agona	1	UY113	Derby	0.5	UY125	Derby	1
UY102	Agona	1	UY114	Derby	0.5	UY126	Derby	0.5
UY103	Derby	≤0.25	UY115	Derby	≤0.25	UY127	Derby	0.5
UY104	Derby	0.5	UY116	Derby	0.5	UY128	Derby	0.5
UY105	Derby	0.5	UY117	Derby	0.5	UY129	Derby	0.5
UY106	Derby	0.5	UY118	Derby	≤0.25	UY130	Derby	0.5
UY107	Derby	0.5	UY119	Derby	≤0.25	UY132	Derby	0.5
UY108	Derby	0.5	UY120	Derby	≤0.25	ATCC 25922	<i>E. coli</i>	0.5
UY109	Derby	0.5	UY121	Derby	0.5	ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	4
UY110	Derby	0.5	UY122	Derby	≤0.25			
UY111	Derby	0.5	UY123	Derby	0.5			

*Los valores están expresados en µg/m. La menor dilución de antibiótico empleada durante los ensayos fue 0.25 mg/mL.

7.4.6. Genes de resistencia a tetraciclinas

La búsqueda de genes transferibles de resistencia a tetraciclinas mostró la presencia de estos en 24 de los genomas estudiados, siendo el cuarto grupo de antibióticos con mayor

representación. De los tres mecanismos transferibles de resistencia a tetraciclinas descritos a la fecha (bombas de eflujo, protección de los ribosomas e inactivación del antibiótico), todos los genes hallados codificaban para bombas de eflujo [*tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*]. Como se mencionó previamente, estos genes codifican para proteínas asociadas a membrana pertenecientes a la familia MFS (Major Facilitator Superfamily), y funcionan intercambiando protones por complejos tetraciclina-cación a contragradiante. De esta manera los genes *tet(A)* y *tet(C)* codifican para bombas inducibles que confieren resistencia a tetraciclina únicamente, mientras que *tet(B)* es capaz de conferir resistencia tanto a tetraciclina como a minociclina (Chopra I, et al., 2001). El gen *tet(A)* fue detectado en 12 genomas, de los cuales la enorme mayoría correspondían al serovar Typhimurium (n=9), el resto fue detectado en *S. Derby*, *S. Dublín* y *S. Hadar*. A su vez, la mayoría de dichos genomas (n=9) correspondían a aislamientos de origen clínico, mientras que dos eran de origen animal y uno de origen alimentario. Con relación al contexto genético, *tet(A)* fue encontrado siempre junto a su gen regulador *tetR*, aunque con entornos variables tanto corriente arriba como corriente abajo de estos, insertos a su vez en plásmidos conjugativos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad (Fig. 45). Si bien, clásicamente *tet(A)* está asociado al transposón Tn1721 (Poirel L, et al. 2018), dicho EGM no pudo ser detectado entre los genomas estudiados. Por otra parte, *tet(B)* fue detectado en ocho genomas pertenecientes a tres serovares distintos: Typhimurium (n=2), Gallinarum (n=5) y Enteritidis (n=1). A diferencia de lo mencionado con relación a *tet(A)*, la mayoría de los aislamientos portadores de *tet(B)* fueron de origen animal (n=7). El entorno genético de éste fue igual para los ocho genomas estando el par *tetR-tet(B)* flanqueado corriente arriba y corriente abajo por dos genes codificantes de reguladores transcripcionales putativos; si bien este gen forma parte del Tn10, no fue posible dilucidar los entornos más allá de los descrito arriba debido al fraccionamiento de los *contigs*.

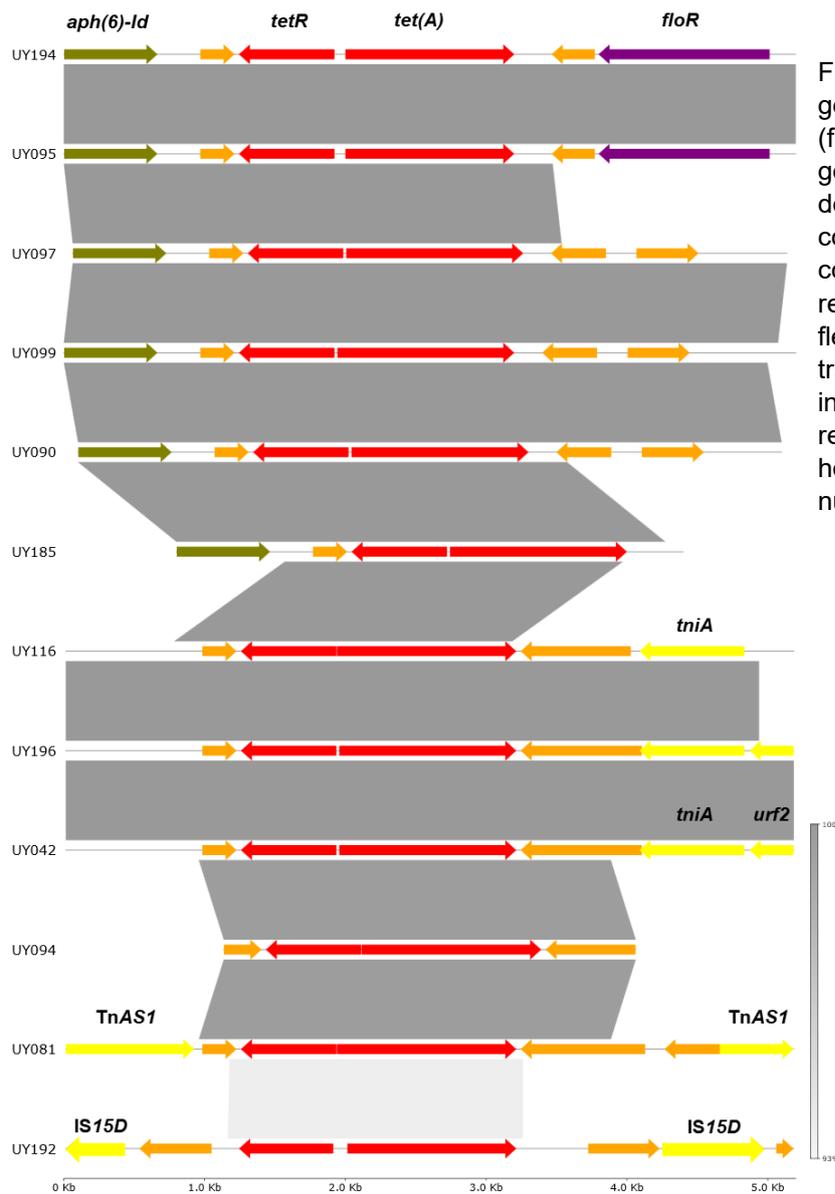


Figura 45. Entorno genético del gen *tet(A)* y su regulador *tetR* (flechas rojas) en los distintos genomas en los que fue detectado. Las flechas naranjas corresponden a genes diversos con función no relacionada a la resistencia antimicrobiana. Las flechas amarillas representan transposones y secuencias de inserción. Los bloques en gris representan regiones de homología (identidad nucleotídica 100--93%).

Por último, *tet(C)* fue detectado en el genoma de cuatro aislamientos de *S. Typhimurium*, de los cuales tres fueron de origen clínico y el restante fue recuperado a partir de huevos. El entorno genético de *tet(C)* se mostró invariable independientemente del origen; en tal sentido, el tándem *tetR-tet(C)* estaba flanqueado corriente arriba por un gen hipotético, y corriente abajo por un gen asociado a la transferencia de material genético, un gen hipotético y un tirosina-recombinasa. Por su parte, la búsqueda de homologías contra la base de datos de GenBank, mostró que este entorno se encuentra bastante conservado y distribuido entre

órdenes tan diversos como Enterobacterales, Pseudomonadales y Burkholderiales, entre otros.

7.4.7. Genes de resistencia a inhibidores de la síntesis del folato

Dentro de los genes que codifican para enzimas que actúan a nivel de la vía del folato, se hallaron 28 genes cuyos productos inhiben la enzima dihidropteroato sintasa (*sul*, n=20) y aquellos que codifican para inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa (*dfr*, n=8). Todos estos genes codifican para enzimas que carecen de afinidad por las sulfonamidas o por trimetoprima. El principal serovar asociado a estos genes fue Typhimurium, y la principal fuente de todos los aislamientos portadores de estos genes correspondió a coprocultivos; no obstante, otras muestras clínicas estaban representadas, así como también las muestras de origen animal, entre otras.

Dentro de los genes *sul*, se hallaron dos alelos, *sul1* y *sul2*, presentes en 8 y 12 genomas respectivamente. En línea con lo reportado por otros autores (van Duijkeren E, et al. 2017), el gen *sul1* fue encontrado invariablemente asociado a el extremo conservado 3'-CS de integrones de clase 1, estando incluso presente en más de una copia en genomas que portaban integrones complejos (cepas UY094 y UY193, por ejemplo). Asimismo, el alelo *sul2* fue hallado mayoritariamente asociado a los genes de resistencia a aminoglucósidos *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (también conocidos como *strA* y *strB*), y al tándem de resistencia a tetraciclina *tet(A)-tetR* (ver Fig. 39), o como único gen de resistencia en la isla ARI-B presente en el plásmido pUY193_C.

Por otra parte, se hallaron cinco alelos distintos de *dfrA*; así, *dfrA1* fue hallado en tres genomas distintos, como gen *cassette* de un integrón de clase 2, junto a los genes *satA* y *ant(3'')-Ia* (Fig. 46), Este integrón se encuentra bastante diseminado entre distintas especies del orden Enterobacterales (<http://integrall.bio.ua.pt>), y al igual que la mayoría de los integrones de clase 2, el gen que codifica para la integrasa presenta un codón stop interno, dando como resultado a una proteína trunca carente de actividad (Wang X, et al., 2021). Por

su parte, el alelo *dfrA12* estaba como primer gen *cassette* del integrón complejo de clase 1 codificado en el plásmido pUY193_C (ver sección 7.6.4.).

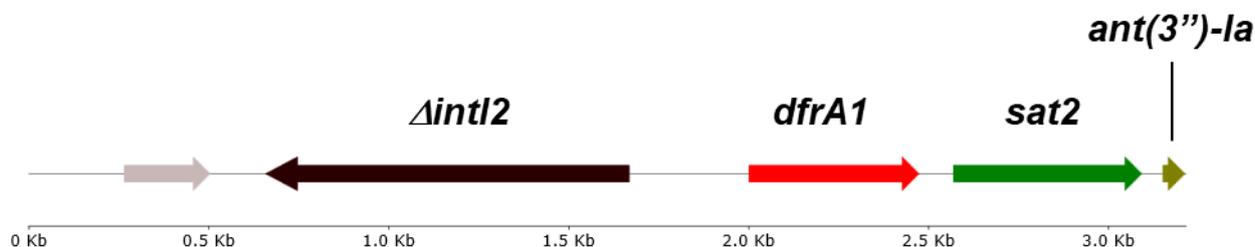


Figura 46. Entorno genético del gen *dfrA1*; este entorno fue detectado en integrones de clase 2 presentes en el genoma de los aislamientos UY054, UY052 y UY053. En los tres aislamientos, el gen que codifica para la integrasa (flecha negra) presentaba un codón de terminación interno, con pérdida de función. Los otros genes presentes en estos integrones correspondieron a *sat2* (flecha verde oscura) que codifican para resistencia a estreptotricina y el gen *ant(3'')-Ia* (flecha verde claro). La flecha gris representa un gen hipotético.

El gen *dfrA14* fue hallado en dos genomas, interrumpiendo en ambos el gen *aph(3'')-Ib*; curiosamente, no se detectaron secuencias de inserción u otros EGM asociados que pudiesen justificar este fenómeno. Finalmente, los alelos *dfrA25* y *dfrA27* se hallaban como genes *cassette*, el primero en un integrón de clase 1 codificado en el plásmido del grupo de incompatibilidad IncN pUY094_N, y el segundo en otro integrón de clase 1 codificado en el plásmido pUY192_H (ver secciones 7.6.1 y 7.6.3., respectivamente).

7.4.8. Genes de resistencia a macrólidos

Si bien los Enterobacteriales, entre ellos *Salmonella* spp. son intrínsecamente resistentes a los macrólidos debido a la baja permeabilidad de la membrana externa a esta familia de antibióticos y a la presencia del sistema de eflujo AcrAB-TolC, entre otros (Ma Y, et al., 2024), entre los genomas analizados se encontraron tres que portaban genes transferibles de resistencia a macrólidos. Específicamente, el gen *ermB* y su regulador *ermBL* fue encontrado en una cepa de *S. Enteritidis* recuperada en el año 2011 y de una cepa de *S. Typhimurium* recuperada en 2012, ambas cepas aisladas de coprocultivos; por otra parte, el gen *mph(A)* fue encontrado en la cepa de *S. Enteritidis* UY193 recuperada en el año 2022, a partir de un

urocultivo. El modo por el cual ambos genes confieren resistencia es diferente; por un lado, el gen *ermB* codifica para una metiltransferasa inducible que agrega un grupo dimetilo al residuo A2058 de la subunidad 23S del ribosoma bacteriano, bloqueando así la interacción entre los macrólidos y los ribosomas. Por otra parte, *mph(A)* codifica para una fosfotransferasa que actúa fosforilando el grupo 2'-OH de la porción desosamina de macrólidos 14C, 15C y 16C, con la concomitante pérdida de actividad antibacteriana (Gomes C, et al., 2017). Con relación a los entornos genéticos, los genes *ermB* se encontraban codificados en dos plásmidos IncI1, secuenciotipo pST80 (pUY050 y pUY094_I). Más allá de la similitud existente entre ambos plásmidos, el contexto inmediato de *ermB* resultó ser distinto. En pUY050, este gen se encontraba flanqueado a ambos lados por dos copias de IS26 en orientación divergente; este bloque a su vez se hallaba corriente debajo de las β -lactamasas *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CTX-M-14} (ver Fig. 31). Por otra parte, en el plásmido pUY094_I *ermB* también estaba localizado entre dos copias de IS26, pero estas se hallaban en orientación directa (Fig. 47).

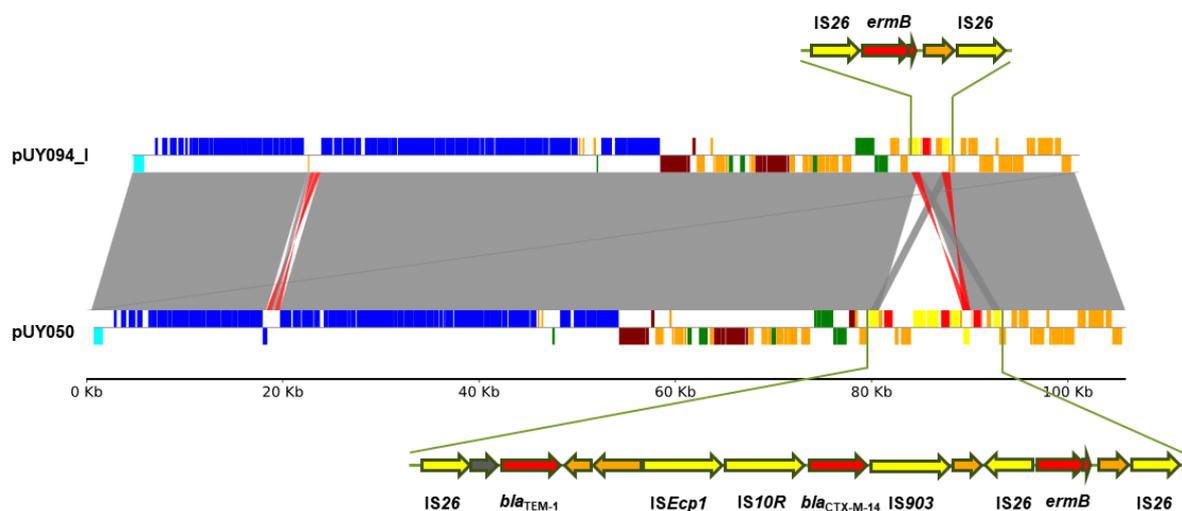


Figura 47. Entorno genético de *ermB* y esquema de los plásmidos IncI1 en los que estaban codificados. Las flechas naranjas representan genes putativos y la flecha en gris oscuro representa un pseudogen. Los rectángulos azules corresponden a genes vinculados a la transferencia plasmídica; los bloques marrones representan genes de partición y los bloques verdes genes vinculados a la estabilidad plasmídica. Los rectángulos naranjas corresponden a genes misceláneos y genes putativos. Los bloques grises representan regiones de homología (identidad nucleotídica $\geq 99\%$), y las tiras rojas representan inversiones de ADN.

En otro orden, el gen *mph(A)* estaba codificado en la isla de resistencia ARI-A en el plásmido pUY193_C, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncC. Dicho gen fue hallado formando parte del operón *mph(A)-mrx(A)-mphR*, flanqueado corriente arriba por IS6100 y corriente abajo por una copia de IS26. Otros autores han descrito la existencia de versiones truncas de este operón, en el cual el regulador *mphR* presenta una delección redundando en la pérdida de resistencia a macrólidos (Xie M, et al., 2022). En este sentido, todos los genes del operón presente en pUY193_C estaban intactos al igual que sus secuencias reguladoras (Fig. 48).

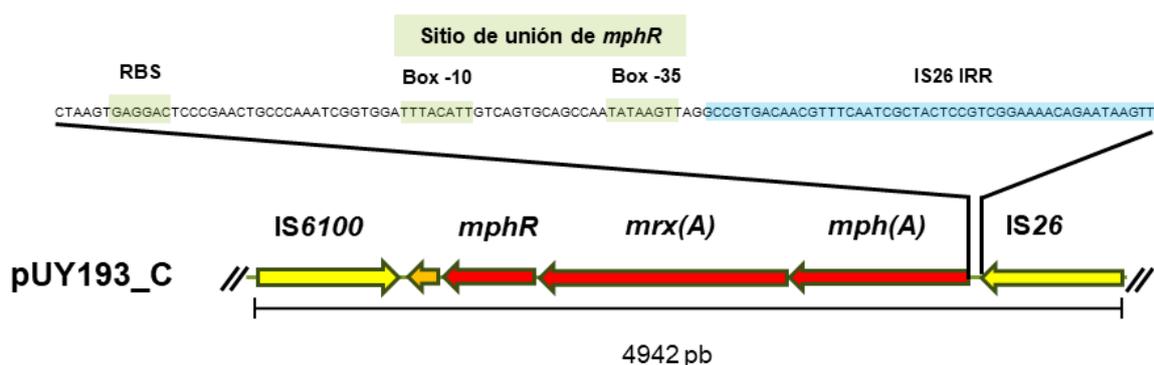


Figura 48. Entorno genético del operón *mph(A)* dentro del plásmido pUY193_C. La flecha naranja representa un gen hipotético. En el diagrama superior se detalla la región reguladora del operón, detallando la región promotora (Box -35 y -10) y la secuencia de unión al ribosoma (RBS). En azul se indica el Invertido repetido derecho (IRR) de la secuencia de inserción IS26.

7.4.9. Genes de resistencia a otras familias de antibióticos

Además de los antibióticos previamente mencionados, entre los genomas analizados se hallaron genes que codifican para resistencia a otras familias de antibióticos y para compuestos con actividad antimicrobiana. En tal sentido, el gen *qacEΔ1* fue detectado en 8 genomas, y en línea con lo reportado por otros autores, invariablemente formando parte del extremo conservado 3'-CS de integrones de clase 1. Este alelo presenta una delección con relación a *qacE*, que da como resultado una proteína transmembrana carente de 16 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal; no obstante, esta variante trunca puede conferir susceptibilidad disminuida frente a productos de amonio cuaternario y a bromuro de etidio (Slipski CJ, et al., 2021).

Por otra parte, se detectaron nueve genes de resistencia a fenicoles. El gen *catA1* fue encontrado en 5 genomas mientras que el gen *catB3* fue hallado en un solo genoma. Estos genes codifican para enzimas que inactivan el cloranfenicol mediante acetilación de la posición C3 y/o C1 de la molécula del antibiótico, resultando en derivados mono o diacetilados carentes de actividad antibiótica (van Duijkeren E, et al., 2017). Con relación al entorno genético, en tres de los genomas *catA1* estaba flanqueado corriente arriba por el transposón TnAS3 y un gen hipotético, y corriente abajo por otro gen hipotético la secuencia de inserción IS1; desafortunadamente, dada la fragmentación de los *contigs* no fue posible en qué tipo de plásmido estaban codificados. Asimismo, en otros dos genomas *catA1* fue hallado codificado en un plásmido pUY193_C (IncC de tipo 2) y en el plásmido pUY192_H (IncHI2A/HI2); en el primero, dicho gen estaba flanqueado por IS4321 corriente arriba y por IS1 corriente abajo, mientras que, en el segundo plásmido, se hallaba flanqueado a ambos lados por copias de IS1 (Fig. 49 A). Por otra parte, el pseudogen $\Delta catB3$ también estaba codificado en el plásmido pUY192_H, pero el extremo 3' del mismo estaba interrumpido por la inserción de IS26, dando como resultado una delección de aproximadamente 30 aminoácidos.

En otro orden, se hallaron otros 3 genes relacionados a resistencia a cloranfenicol, específicamente *floR* (n=2) y *cmlA* (n=1). Ambas variantes codifican para bombas de extrusión específicas que median tanto resistencia a cloranfenicol como a florfenicol. Así, *cmlA* estaba codificado en la tercera región variable del integrón complejo de clase 1 presente en el plásmido pUY193_C (ver sección 7.6.4.). A su vez, el entorno de *floR* estaba conservado en los dos genomas en los que fue hallado; en este sentido, dicho gen estaba asociado a ISCR1 corriente arriba, y al tándem *tet(A)-tetR* corriente abajo (Fig. 49 B). Contrario a lo reportado por van Duijkeren y cols., *floR* no fue hallado en *clusters* cromosómicos de resistencia si no codificado en plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncC. De hecho, la comparación de este entorno contra la base de datos de Genbank, muestra numerosas coincidencias, en distintas especies, y en la mayoría de los casos correspondientes a secuencias plasmídicas.

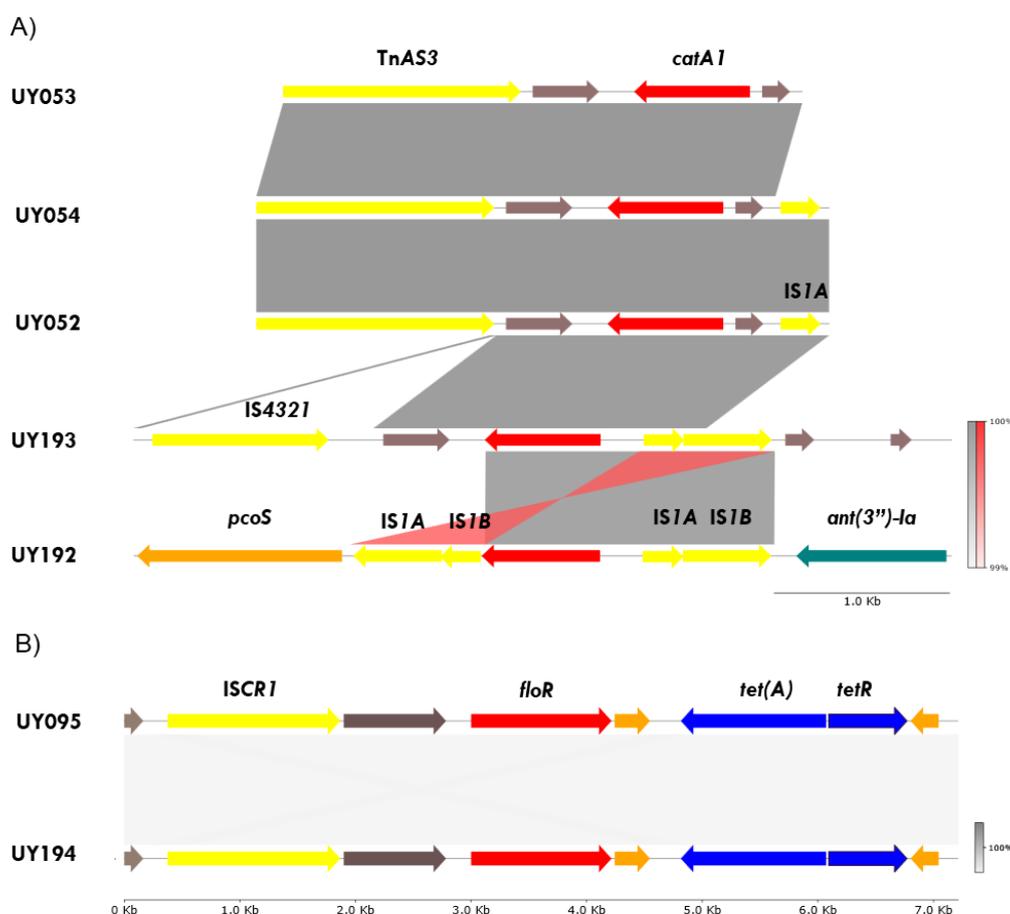


Figura 49. Entorno genético de los genes de resistencia a cloranfenicol *catA1* (panel A) y *floR* (panel B). Las flechas oscuras grises representan genes hipotéticos, las flechas naranjas genes varios con función conocida; las flechas amarillas representan distintas secuencias de inserción o transposones. Los bloques grises representan regiones de homología (identidad nucleotídica 95 a $\geq 99\%$). El bloque rojo indica inversiones de ADN.

Finalmente, resultó llamativo el hallazgo en 5 genomas de la presencia del gen *bleO* (también llamado *ble_{MBL}*), que confiere susceptibilidad disminuida a bleomicina. Este es compuesto natural producido por *Streptomyces verticillus*, y utilizado principalmente como agente anticancerígeno (Hooban B, et al., 2022). En uno de los genomas este gen fue hallado en su contexto clásico, asociado a *bla_{NDM-1}* (Dortet L, et al., 2012), ambos insertos en el transposón complejo de clase 1 del plásmido pUY193_C; asimismo, *bleO* también fue hallado flanqueado a ambos lados por dos copias de IS26 en orientación convergente, codificado a su vez en un plásmido de tipo IncX1 (Fig. 50). Este entorno inmediato parece estar conservado en los otros 3 genomas, pero dada la fragmentación de los *contigs* no fue posible determinar si también estaban en plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad u otros.

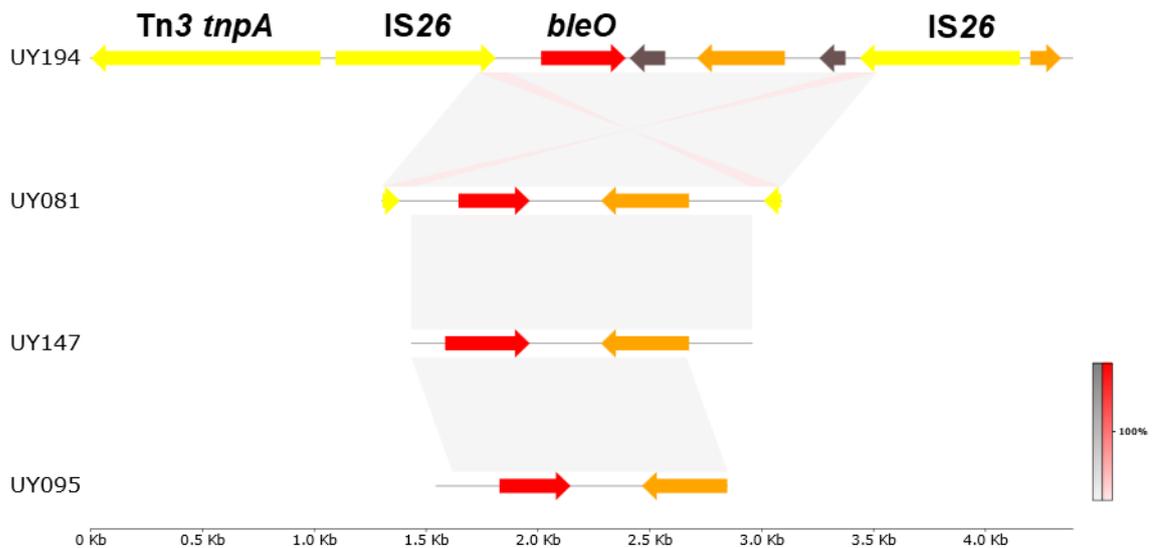


Figura 50. Entorno genético del gen de resistencia a bleomicina *bleO* (flechas rojas). La flecha oscura representa un gen hipotético, las flechas naranjas el gen de la piridoxamina 5'-fosfato oxidasa. Los bloques grises corresponden a regiones de homología (identidad nucleotídica $\approx 95\%$), y las líneas rojas indican inversiones de ADN.

7.4.10. Perfiles de resistencia y correlación entre genotipo y fenotipo de RAM

Se evaluó el fenotipo de resistencia en 68/212 aislamientos; éstos correspondían a aquellos genomas que dieron resultados positivos en el estudio informático de predicción genes RAM (sin tomar en cuenta al gen *aac(6')-Iaa*, inherente a todos los aislamientos de *S. enterica* estudiados). En este sentido, 20 de tales aislamientos mostraron ser multiresistentes (resistencia y/o susceptibilidad disminuida al menos a un agente en tres o más familias de antibióticos); esto representa un 29% de las cepas resistentes (o un 9.4% del total de los genomas analizados). Las resistencias más frecuentes fueron a estreptomicina (n=42), β -lactámicos (n=28), tetraciclina (n=26), quinolonas (n=15), sulfonamidas y kanamicina (n=13 c/u), gentamicina y cloranfenicol (n=10 c/u). Con relación a la resistencia a los β -lactámicos, la resistencia a cefotaxima fue detectada en 14 aislamientos, a ceftazidima en 7 aislamientos, a cefoxitina en 4 aislamientos y a imipenem en 1 aislamiento. Con relación a las quinolonas, 14 aislamientos mostraron susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina, y otro de los aislamientos se mostró resistente a dicho antibiótico. Con relación a los distintos perfiles de

resistencia, estos se muestran en la figura 51. Por otra parte, si bien los estudios bioinformáticos no indicaron la existencia de genes transferibles de resistencia a la colistina, dada su importancia como terapéutica para el tratamiento de infecciones por microorganismos multirresistentes, se estudió la susceptibilidad a este fármaco en la colección de aislamientos de *S. enterica*, mostrándose todos estos aislamientos como sensibles a la colistina (CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$).

De manera interesante, 15/20 aislamientos multirresistentes correspondían al serovar Typhimurium y los restantes, a los serovares Enteritidis (n=2), Dublín, Derby y Hadar. En este sentido, el principal aporte de genes RAM está dado por cepas del serovar Typhimurium, principalmente recuperadas de coprocultivos; el segundo serovar relevante en el aporte de genes RAM es Derby, recuperado de muestras tan diversas como muestras clínicas, huevos, pollos y alimentos. Por otra parte, el aporte de genes RAM por parte de *S. Enteritidis* sería el tercero en frecuencia, lo cual de alguna manera resulta llamativo ya que como se mencionó anteriormente constituye el principal serotipo dentro de la colección analizada. Asimismo, se vio una asociación entre algunos genes específicos con ciertos serovares y muestras, como *fosA7* y *bla*_{TEM-1a} con el serovar Derby y huevos, los genes *tet(A)*, *tet(C)*, *aph(3'')-Ib*, *sul1*, *sul2* con *S. Typhimurium*, y *tet(B)* con *S. Gallinarum* obtenido de pollos, entre otros (Fig. 52).

Con relación a la correlación genotipo-fenotipo RAM, los fenotipos de resistencia predichos a partir de los genotipos variaban tanto en sensibilidad (100-0%) como en especificidad (100-84%) entre los genomas estudiados. Así, la mayor sensibilidad de predicción del fenotipo de resistencia se correspondió a fluoroquinolonas, tetraciclina, sulfafurazol, trimetoprim-sulfametoxazol, azitromicina, fenicoles, y β -lactámicos (100% c/u); por otro lado, los niveles más bajos de sensibilidad de predicción se registraron para la resistencia a amikacina y a fosfomicina (25 y 0%, respectivamente). Por otra parte, en cuanto a la especificidad, salvo para las fluoroquinolonas y para el sulfafurazol, todos los antibióticos mostraron valores de 100%. El coeficiente de correlación kappa global ($\kappa=0.76$) mostró que el genotipo predicho mediante WGS es moderadamente predictor del fenotipo de resistencia.

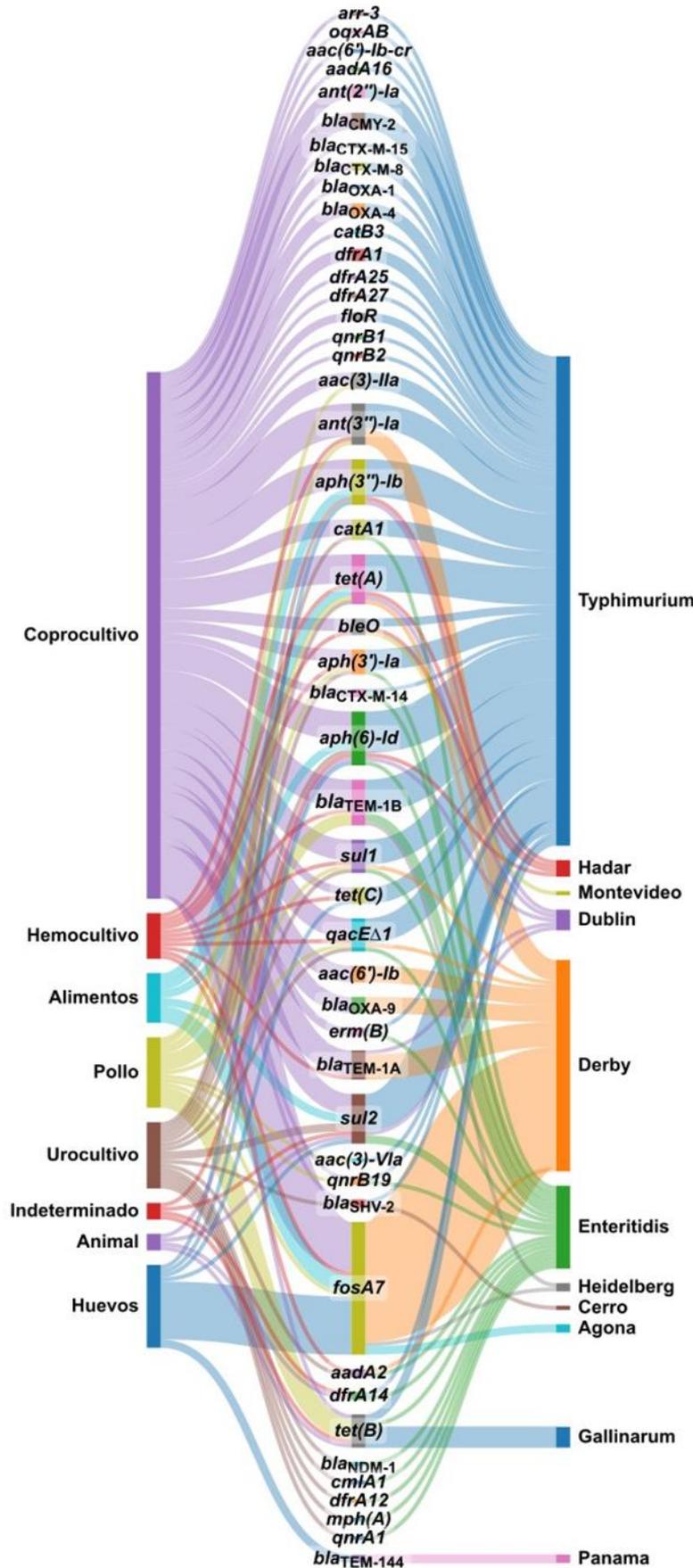


Figura 52. Diagrama de Sankey que muestra la asociación entre los distintos genes RAM (centro), los serovares de *S. enterica* en donde fueron detectados (derecha), y el origen de las muestras que portaban dichos genes (izquierda). El largo de cada nodo representa la frecuencia relativa de cada elemento en el gráfico; por otra parte, los flujos (bandas curvas) indican las relaciones cuantitativas entre los distintos nodos. En el esquema es posible observar la asociación entre algunos genes específicos con serovares puntuales. Del mismo modo, se puede apreciar la predominancia de ciertos genes RAM con muestras específicas. Asimismo, se ve que serovares de *S. enterica* se encontró el mayor número y la mayor diversidad de genes RAM. Diagrama creado en <https://sankeymatic.com/build/>

No obstante, para β -lactámicos, trimetoprim-sulfametoxazol, fenicoles, azitromicina y tetraciclina existe una correlación perfecta entre el genotipo y el fenotipo de resistencia ($\kappa=1$); del mismo modo, para kanamicina y estreptomina el grado de correlación es casi perfecto ($\kappa>0.9$), para gentamicina se vio un fuerte grado de correlación ($\kappa=0.89$), y en el caso de las sulfonamidas el nivel de correlación fue moderado ($\kappa=0.78$). Los niveles más bajos de correlación entre genotipo y fenotipo correspondieron, en orden descendiente a tobramicina, fluoroquinolonas y amikacina ($\kappa=0.58-0.39$) [tabla 7].

Tabla 7. Correlación genotipo-fenotipo de RAM entre los distintos aislamientos de *S. enterica*.

Antibiótico	Fenotipo R		Fenotipo S		Sensibilidad %	Especificidad %	Precisión %	Kappa *
	Genotipo R (VP)	Genotipo S (FP)	Genotipo R (FN)	Genotipo S (VN)				
Fluoroquinolonas	5	10	0	53	100	84,13	0,85	0,44
Tetraciclina	24	0	0	44	100	100,00	1	1
Sulfafurazol	9	4	0	55	100	93,22	0,94	0,78
SXT	8	0	0	68	100	100,00	1	1
Fenicoles	7	0	0	61	100	100,00	1	1
Azitromicina	3	0	0	65	100	100,00	1	1
Fosfomicina	0	0	32	36	0	100,00	0,53	0
Kanamicina	10	0	2	54	83	100,00	0,97	0,91
Gentamicina	10	0	2	56	83	100,00	0,97	0,89
Estreptomina	22	0	2	44	92	100,00	0,97	0,93
Amikacina	1	0	3	64	25	100,00	0,96	0,39
Tobramicina	5	0	6	57	45	100,00	0,91	0,58
β -lactámicos	28	0	0	40	100	100,00	1	1

R: Resistente; S: Susceptible; VP: Verdadero positivo, gen RAM presente y resistente; FP: Falso positivo, ausencia de gen RAM y resistente; VN: Verdadero negativo, ausencia de gen RAM y susceptible; FN: Falso negativo, presencia de gen RAM y susceptible.

*Estadístico Kappa (κ) =1 (correlación perfecta), >0.9 (correlación casi perfecta), 0-80-0.90 (correlación fuerte), 0.60-0.79 (correlación moderada), 0.40-0.59 (correlación débil), 0.20-0.39 (correlación mínima), 0.0-0.19 (ausencia de correlación)

Un caso particular constituye la total ausencia de correlación ($\kappa=0$) entre la presencia de genes *fosA7* y su correspondiente fenotipo de resistencia a fosfomicina; en tal sentido, y como se mencionó en el apartado 7.4.5., todos los aislamientos que portaban este gen presentaron valores de CIM que se interpretan como susceptibles a la fosfomicina.

Posteriormente, se compararon los niveles de resistencia antibiótica entre aquellos aislamientos de *S. enterica* recuperados a partir del año 2001, con los datos nacionales publicados previamente (Macedo M, et al. 2006). En tal sentido se vio un aumento estadísticamente significativo en la resistencia a β -lactámicos, en particular a las cefalosporinas de primera y tercera generación; del mismo modo, también se observó una

disminución estadísticamente significativa a la estreptomina (tabla 8). Por otra parte, si bien fue posible constatar cambios, tanto aumento como disminución, en los niveles de resistencia frente a algunos antibióticos, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas

Tabla 8. Comparación de la resistencia en *Salmonella*, por distintos periodos.

Antibiótico	Periodo			Valor-p ^b
	1976-1988 ^a n(=133) n (%)	1989-2000 ^a (n=125) n (%)	2001-2022 (n=130) n (%)	
Ampicilina	37 (27.8%)	9 (7,2%)	17 (13,07%)	0,148
Cefalotina	29 (21.8%)	6 (4,8%)	17 (13,07%)	<0,05
Cefoxitina	0 (0%)	0 (0%)	4 (3,07%)	0,122
Cefotaxima	0 (0%)	0 (0%)	14 (10,7%)	<0,001
Ceftazidima	0 (0%)	0 (0%)	7 (5,4%)	<0,05
Ácido Nalidíxico	30 (22.6%)	3 (2,4%)	10 (7,7%)	0,084
Tetraciclina	49 (36.8%)	17 (13,6%)	17 (13,07%)	1
Sulfafurazol	43 (32.3%)	14 (11,2%)	10 (7,7%)	0,394
Trimetoprim/Sulfametoxazol	24 (18.0%)	5 (4%)	5 (3,8%)	1
Tobramicina	13 (9.8%)	1 (0,8%)	2 (1,5%)	1
Gentamicina	16 (12.0%)	0 (0%)	5 (3,8%)	0,06
Amikacina	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,07%)	1
Cloranfenicol	17 (12.8%)	1 (0,8%)	4 (3,07%)	0,371
Estreptomina	84 (63.2%)	71 (56,8%)	13 (10%)	<0,001
Kanamicina	26 (19.5%)	2 (1,6%)	3 (2,3%)	1
Azitromicina	0 (0%)	0 (0%)	3 (2,3%)	0,247
Imipenen	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,07%)	1

^a Datos tomados de Macedo M, et al 2009; ^b Significancia estadística entre los períodos 1989-2000 y 2001-2022.

7.4.11. Ensayos de evolución neutra

De manera similar a lo hecho para los alelos de *fosA7* presentes en los genomas analizados se realizó un ensayo estadístico de evolución neutra para los distintos genes de resistencia presentes a lo largo del tiempo. Así, para los genes *bla*_{TEM-1}, *aph(3'')*-*Ib* y *ant(3'')*-*Ia*, el ensayo estadístico mostró la existencia de selección positiva, sugiriendo que han sido preservados por eventos de presión de selección; mientras tanto, para los genes *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* y *aac(6')*-*Ib*, los resultados del test estadístico sugieren que la deriva genética estaría actuando sobre éstos, y por lo tanto cualquier cambio introducido tendría chances de ser fijado en la población. Por el contrario, para *aph(6')*-*Id*, se descarta la hipótesis neutra en favor

de la hipótesis de selección purificadora o negativa; en tal sentido, la mayoría de las sustituciones aminoacídicas conllevarían una pérdida de función, mientras que algunos cambios serían neutros, siendo fijados o no en la población de manera aleatoria (tabla 9).

Tabla 9. Resultados del ensayo de evolución neutral

Gen	Selección purificadora	Selección positiva	Neutralidad
<i>bla_{TEM-1}</i>	HA: dN<dS = 0.04	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 0.08
<i>sul2</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>sul1</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>tet(B)</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>tet(C)</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>tet(A)</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>aph(6')-Ia</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 0.15	HA: dN≠dS = 0.29
<i>aph(3'')-Ib</i>	HA: dN<dS = 0.22	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 0.43
<i>ant(3'')-Ia</i>	HA: dN<dS = 0.07	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 0.15
<i>aac(6')-Ib</i>	HA: dN<dS = 1	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 1
<i>fosA7</i>	HA: dN<dS = 0.03	HA: dN>dS = 1	HA: dN≠dS = 0.05

HA: Hipótesis alternativa; dN: sustituciones no sinónimas por sitio no sinónimo; dS: sustituciones sinónimas por sitio sinónimo. Los valores corresponden a probabilidad de rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa.

7.5. Estudio del Plasmidoma.

7.5.1. Descripción

La búsqueda de grupos de incompatibilidad mostró la presencia de 562 coincidencias entre los 212 genomas analizados, distribuidos a su vez en 37 replicones distintos. Con relación a la distribución de estos, se vio que 162/212 de los genomas analizados presentaban al menos uno de tales elementos de segregación plasmídica. En tal sentido, la media de grupos de incompatibilidad por genoma fue de 2.46, siendo los valores mínimos y máximos 0 y 8, respectivamente (Fig. 53). Por otra parte, la distribución de replicones presentó variabilidad entre los distintos serovares, desde 0 a 3.46 (tabla 10); asimismo, cabe destacar la existencia de un marcado sesgo en nuestro conjunto de datos, en el cual serovares como Enteritidis y Typhimurium eran mayoritariamente predominantes (aprox. 54% del *dataset*), mientras que

serovares como Cerro y Paratyphi B (entre otros), estaban representados por un único genoma.

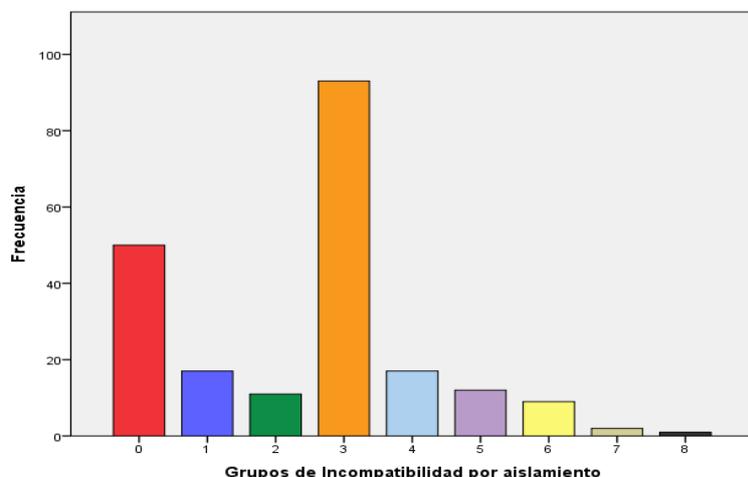


Figura 53. Gráfico de la distribución de frecuencias grupos de incompatibilidad por aislamiento. En tal sentido, Los aislamientos estudiados presentaron desde ninguno hasta 8 grupos de incompatibilidad, siendo los aislamientos portando 3 grupos de incompatibilidad los más frecuentes.

El análisis estadístico (test de Levene, ANOVA de Welch, y corrección de Games-Howell) de la media de grupos de incompatibilidad mostró diferencias estadísticamente significativas entre algunos de los serovares mayoritarios (Fig. 54 A).

Tabla 10. Estadístico descriptivo de grupos de incompatibilidad plasmídica en función del serovar.

Serovar	Media	N° de genomas	Desv. Estándar
Agona	2.00	2	2.828
Anatum	1.00	1	-
Cerro	1.00	1	-
Choleraesuis	3.00	2	0
Derby	1.28	29	1.279
Dublín	3.14	14	0.535
Enteritidis	2.89	63	1.309
Gallinarum	2.14	21	2.056
Give	0	2	0
Hadar	3.00	1	-
Heidelberg	3.00	1	-
Livingstone	0	1	-
Montevideo	0.14	14	0.535
Orianenburg	0	2	0
Panamá	0.67	3	0.577
Paratyphi B	0	1	-
Seftenberg	0	2	0
Typhimurium	3.69	52	1.652
Total	2.46	212	1.783

De manera similar a lo recientemente reportado por Robertson y cols. (Robertson J, et al., 2023), en los genomas de *S. enterica* uruguayos encontramos diferencias significativas en la portación plasmídica entre aislamientos con flagelos monofásicos y aislamientos con flagelos bifásicos (72.1% vs. 86.2%, respectivamente); del mismo modo, se encontraron diferencias significativas en la media del número de replicones entre ambos grupos, siendo esta mayor para los aislamientos con flagelos bifásicos (3.32 vs 2.08, respectivamente) (Fig. 54 B).

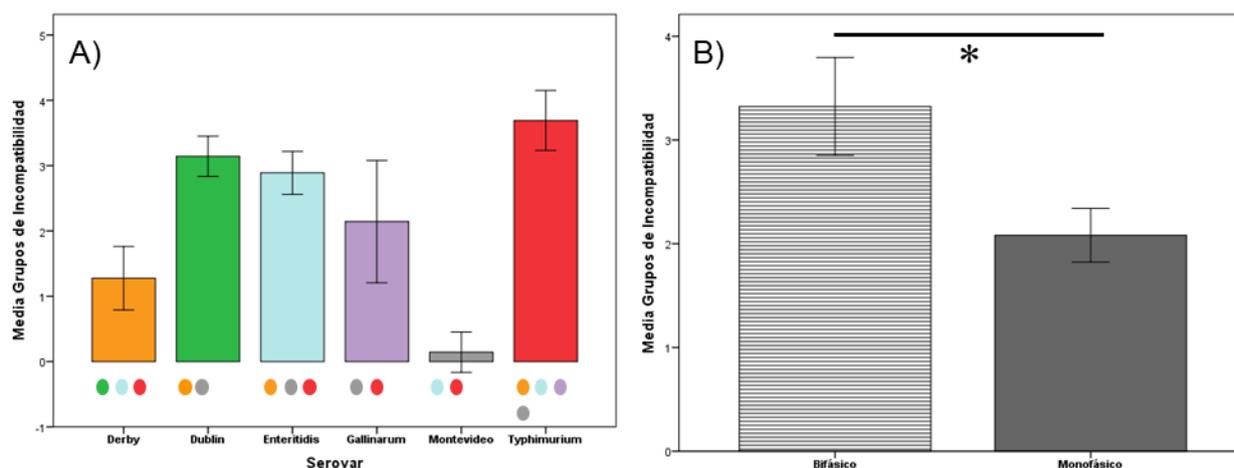


Figura 54. Análisis estadístico del recuento de grupos de incompatibilidad. Las barras de error representan los correspondientes desvíos estándar. Panel A) Gráfico comparativo de la media del número de grupos de incompatibilidad plasmídica entre los serovares con mayor representación. Los óvalos de color debajo de las barras indican frente a cuáles serovares se encontró una diferencia estadísticamente significativa. En el panel B) se graficó la media de replicones con relación a aquellos genomas con flagelos monofásicos o bifásicos.

7.5.2. Orígenes de replicación.

Como se mencionó en el apartado anterior, se identificaron 37 replicones distintos distribuidos en 162 de los genomas estudiados. En línea con lo publicado por otros investigadores (Hennequin C, et al., 2022; Robertson J, et al., 2023), el grupo de incompatibilidad más abundante fue IncF ($n=382$ contigs), dentro del cual se identificaron principalmente los replicones IncFII(pAR0022), IncFII(S) y IncFIB(S). Por otro lado, dentro de los plásmidos de pequeño tamaño, los más frecuentemente detectados fueron aquellos pertenecientes al grupo Col o plásmidos colicinérgicos ($n=80$). Además, otro de los replicones con alta representatividad correspondió a IncX ($n=40$) (Fig. 55), aunque fue frecuentemente hallado

en *contigs* que contenía otros grupos replicones de la familia IncF, sugiriendo la existencia de plásmidos híbridos en la muestra analizada.

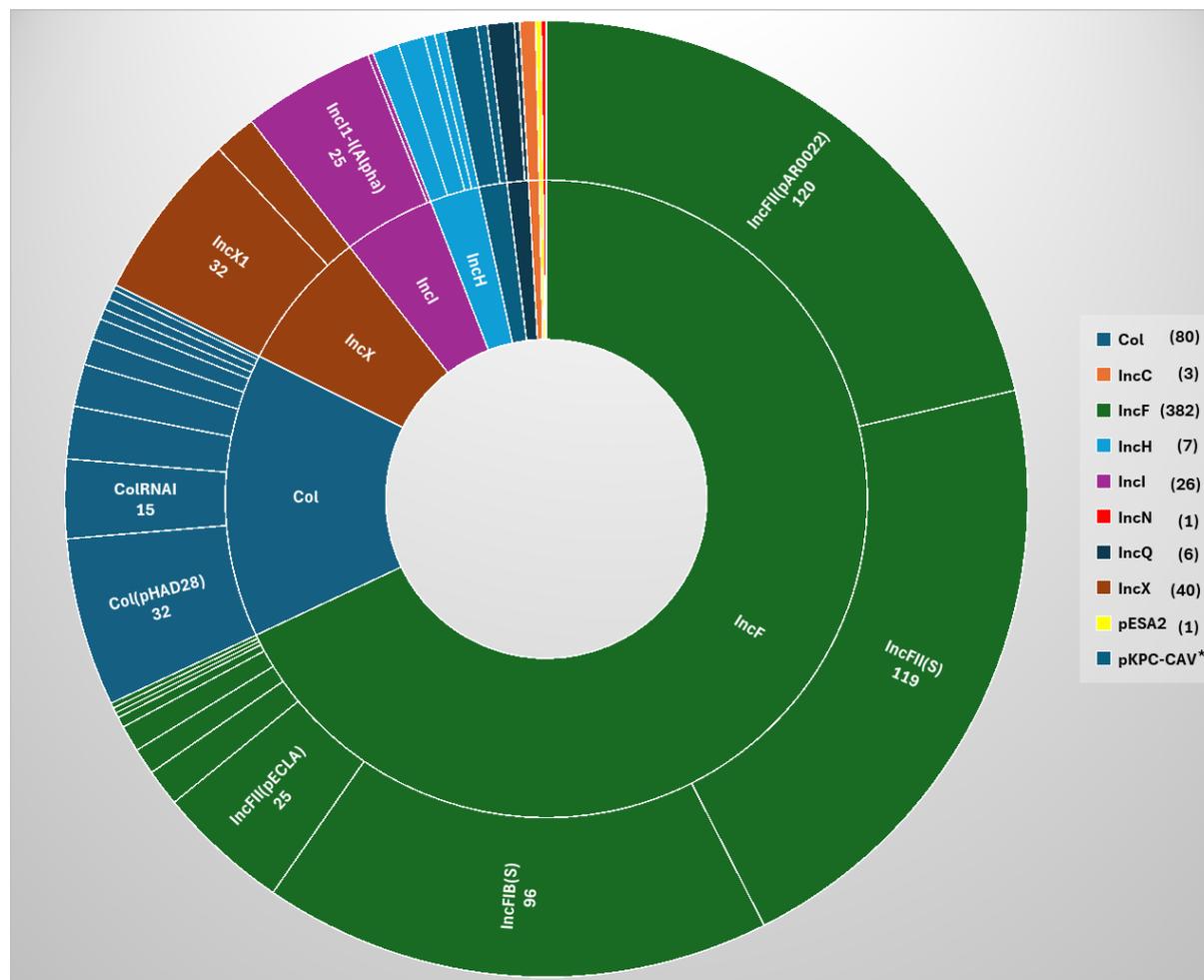


Figura 55. Distribución de los replicones plasmídicos identificados en los genomas analizados. En el círculo interior se muestran las distintas “familias” de replicones presentes; en el círculo exterior se detalla las distintas variantes halladas dentro de cada familia. El asterisco corresponde a 8 *contigs* que portaban replicones de la familia pKPC-CAV.

Por otra parte, el contenido de replicones plasmídicos presentó variaciones en función del serovar. En tal sentido, los serovares Typhimurium y Derby presentaron la mayor diversidad de replicones. Los distintos genomas de *S. Typhimurium* (además de los replicones IncFIB/FII del plásmido de virulencia), mostraron la presencia de otros grupos de incompatibilidad como IncHI2/2a, IncN, IncX1 e Incl1- α , comúnmente implicados en la resistencia a diversas familias de antibióticos. Asimismo, los distintos genomas de *S. Derby* portaban grupos de incompatibilidad plasmídica como IncFIA/FIB(AP001918) (implicados en la adaptación de este serovar a bovinos y suinos), pKPC-CAV1193, IncQ1, ColRNA y ColpVC, entre otros. Por

su parte, los replicones más frecuentemente asociados al serovar Enteritidis fueron IncFIB(S), IncFII(S) e IncFII(pAR0022), correspondientes al plásmido de virulencia de dicho serovar; no obstante, también se identificaron genomas de este serovar portando otros replicones plasmídicos de importancia clínica como IncI1- α , e IncC. Asimismo, si bien algunos grupos de incompatibilidad se encuentran difundidos entre distintos serovares, otros replicones específicos parecen estar asociados a serotipos puntuales, como IncHI1A/HI1B/FIA(HI1) encontrado únicamente en genomas de *S. Gallinarum*, ó pKPC-CAV1193 encontrado solamente en *S. Derby* (Fig. 56).

7.5.3. Análisis de los plásmidos de tipo Inc1

Como fue mencionado anteriormente, 162/212 genomas analizados presentaban replicones plasmídicos pertenecientes a diversos grupos de incompatibilidad. Asimismo, en 26 de tales genomas se detectó la presencia de plásmidos de tipo IncI1, lo que representa el 16% de las cepas con plásmidos identificables; los 26 plásmidos fueron circularizados mediante secuenciación. La relevancia de este hallazgo radica en que, al igual que lo reportado por otros autores (Han J, et al., 2018), en la presente tesis estos plásmidos fueron los más frecuentemente asociados a genes RAM. Por otra parte, los plásmidos IncI1 presentaron tamaños que oscilaron entre 83-129 Kb, y fueron recuperados en aislamientos obtenidos a lo largo de cinco décadas, provenientes de diversas fuentes y serovares. No obstante, se observó un marcado predominio en *S. Typhimurium* (n=16), seguido por *S. Derby* (n=5), *S. Enteritidis* (n=3), *S. Cerro* (n=1) y *S. Heidelberg* (n=1) (tabla 11).

La tipificación de estos plásmidos mediante el esquema de clasificación propuesto por García-Fernández y cols. (García-Fernández A, et al., 2008) reveló la presencia, en la colección de aislamientos analizados, de plásmidos pertenecientes a secuenciotipos no descritos previamente (pST335 a 339, ver tabla 10). Se buscó inferir la filogenia de los plásmidos IncI1 presentes en los genomas analizados. Para ello, se realizó el alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los cinco alelos utilizados en el esquema pMLST (*repl*, *ardA*,

trbA, *sogS* y *pilL*) para cada plásmido, y se construyó un dendrograma mediante el método Neighbor-Joining.

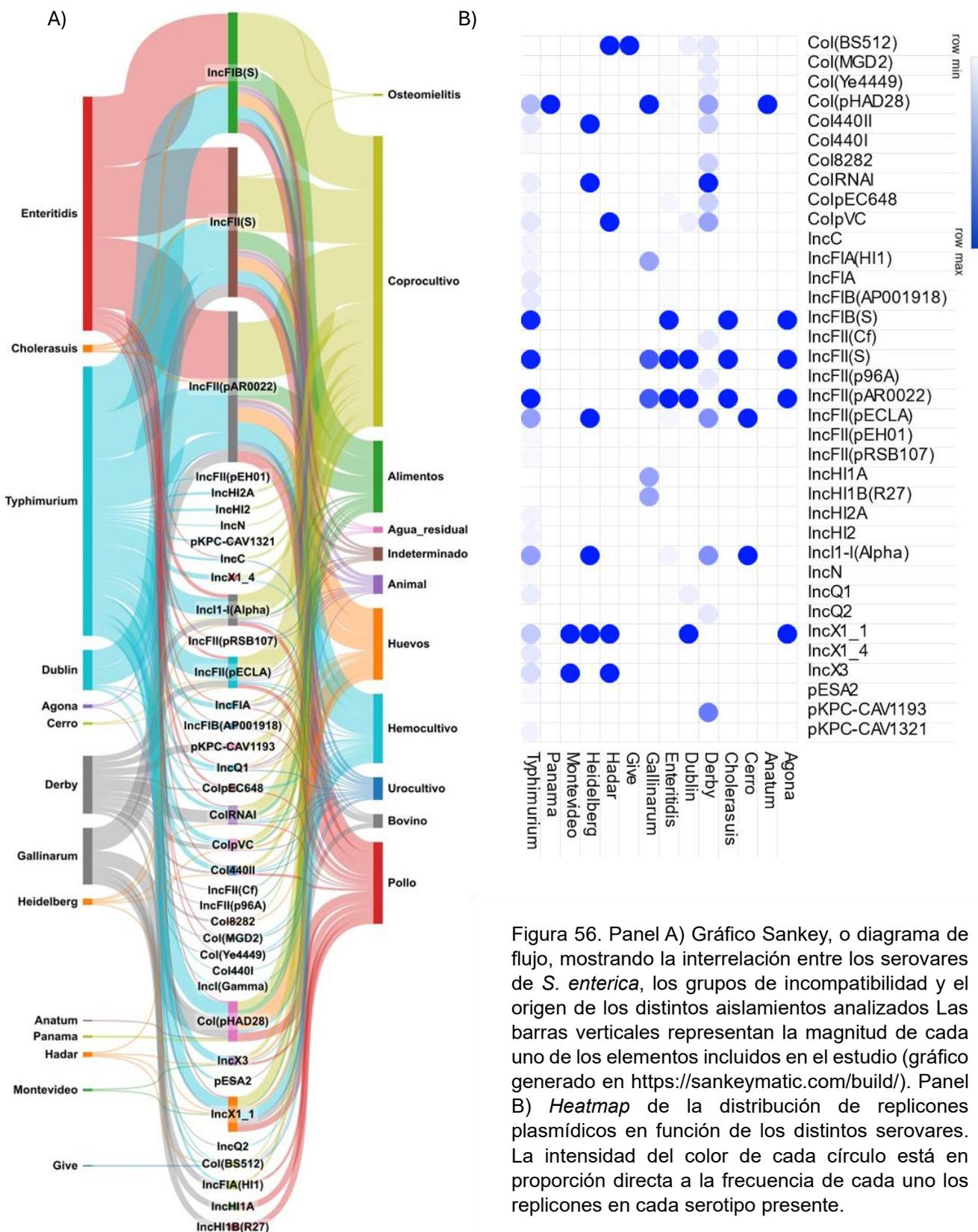


Figura 56. Panel A) Gráfico Sankey, o diagrama de flujo, mostrando la interrelación entre los serovares de *S. enterica*, los grupos de incompatibilidad y el origen de los distintos aislamientos analizados. Las barras verticales representan la magnitud de cada uno de los elementos incluidos en el estudio (gráfico generado en <https://sankeymatic.com/build/>). Panel B) *Heatmap* de la distribución de replicones plasmídicos en función de los distintos serovares. La intensidad del color de cada círculo está en proporción directa a la frecuencia de cada uno de los replicones en cada serotipo presente.

Tabla 11. Principales características de los plásmidos Incl1 presentes en *S. enterica*, ordenados cronológicamente.

Plásmido	Serovar	Año	Origen	pMLST	Tamaño	Genes RAM	Sistemas TA	Bacteriocina	Virulencia
pUY052	Typhimurium	1978	Coprocultivo	pST33, cc3	94kb	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>pndAC; yacAB</i>	-	-
pUY058	Typhimurium	1978	Aguas residuales	pST200, cc2	101kb	-	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY056	Typhimurium	1979	Hemocultivo	pST335	120kb	-	<i>pndAC</i>	-	<i>ibeB</i>
pUY060	Typhimurium	1983	Embutidos	pST288, cc2	93kb	-	<i>pndAC</i>	<i>cia</i>	-
pUY111	Derby	1984	Coprocultivo	pST272, cc2	93kb	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-9} , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	<i>pndAC</i>	-	-
pUY110	Derby	1984	Coprocultivo	pST31, cc3	90kb	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-9} , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	<i>pndAC</i>	-	-
pUY109	Derby	1984	Coprocultivo	pST336	93kb	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-9} , <i>ant(3'')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	<i>pndAC</i>	-	-
pUY108	Derby	1984	Coprocultivo	pST336	83kb	-	<i>pndAC</i>	-	-
pUY113	Derby	1990	Coprocultivo	pST207	87kb	-	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	<i>icm/dot</i>
pUY072	Typhimurium	1994	Coprocultivo	pS337	85kb	-	<i>pndAC; relE/parE</i>	-	-
pUY085	Heidelberg	2000	Pollo	pST12, cc12	93kb	-	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY172	Enteritidis	2002	Pollo	pST36, cc5	94kb	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>pndAC; relE/parE</i>	<i>cia</i>	-
pUY086	Typhimurium	2002	Coprocultivo	pST338	89kb	-	<i>pndAC</i>	-	-
pUY096	Typhimurium	2007	Pollo	pST26, cc26	108kb	<i>sul1, ant(3'')-Ia, aac(3)-VIa</i>	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	<i>icm/dot</i>
pUY031	Enteritidis	2007	Coprocultivo	pST59, cc5	89kb	-	<i>pndAC; yacA/copG</i>	-	-
pUY093	Typhimurium	2009	Coprocultivo	pST12, cc12	98kb	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>pndAC; yacAB; ccdAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY092	Typhimurium	2009	Coprocultivo	pST12, cc12	101kb	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>pndAC; yacAB; ccdAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY099	Typhimurium	2011	Alimentos	pST339	94kb	-	<i>pndAC; ccdAB; vag/vap; relE/parE</i>	<i>cva</i>	-
pUY050	Enteritidis	2011	Coprocultivo	pST80, cc31	105kb	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>ermB</i>	<i>pndAC</i>	-	-
pUY095	Typhimurium	2012	Coprocultivo	pST113	89kb	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>pndAC</i>	<i>cia</i>	-
pUY094	Typhimurium	2012	Coprocultivo	pST80, cc31	96kb	<i>ermB</i>	<i>pndAC</i>	-	-
pUY194	Typhimurium	2012	Coprocultivo	pST113	90kb	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>pndAC</i>	<i>cia</i>	-
pUY195	Typhimurium	2012	Urocultivo	pST12, cc12	106kb	<i>bla</i> _{SHV-2}	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY196	Typhimurium	2013	Coprocultivo	pST12, cc12	101kb	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>pndAC; yacAB; ccdAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY197	Typhimurium	2013	Coprocultivo	pST12, cc12	99kb	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>pndAC; yacAB; ccdAB</i>	<i>cia</i>	-
pUY198	Cerro	2013	Coprocultivo	pST12, cc12	112kb	<i>bla</i> _{SHV-2}	<i>pndAC; yacAB</i>	<i>cia</i>	-

TA: Toxina-Antitoxina; pMLST: plasmid Multi-Locus Sequence Typing; cc: Complejo clonal.

En tal sentido, si bien en líneas generales hay concordancia entre nuestro estudio filogenético con el método de tipificación pMLST, se hallaron algunas discrepancias (Fig. 57); así, sería esperable que plásmidos pertenecientes a un mismo complejo clonal quedaran agrupados dentro de un mismo clado, sin embargo, vimos que plásmidos pertenecientes al complejo clonal cc2 quedaron agrupados en tres clados diferentes; del mismo modo dos plásmidos pertenecientes al cc5, también se agruparon en clados distintos. Esto indicaría que o bien es necesario un sistema más sensible para clasificar a los plásmidos, o bien que es necesario ajustar el análisis filogenético.

Por otra parte, el alineamiento y análisis de sintenia y el estudio de pangenoma de los plásmidos incl1 de *S. enterica* mostró, en primer lugar, un alto grado de conservación en su estructura general, independientemente del origen de la muestra, y de la fecha de aislamiento de la cepa (Fig. 58).

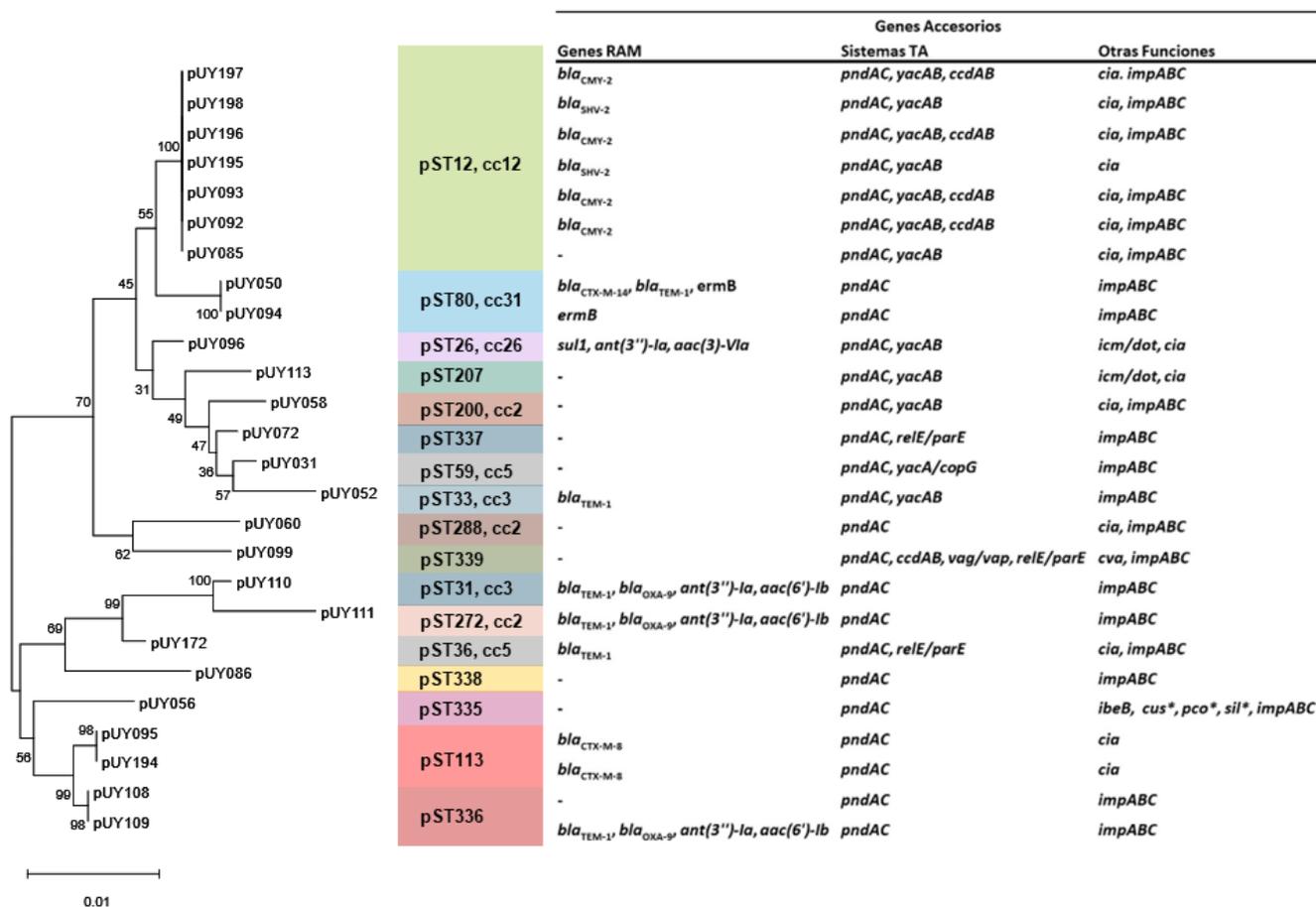


Figura 57. Dendrograma de los plásmidos IncI1 presentes en los aislamientos de *S. enterica* y tabla correspondiente de genes accesorios con función conocida. El dendrograma fue inferido a partir de las secuencias nucleotídicas de los alelos utilizados en el esquema pMLST aplicado a plásmidos de tipo IncI. Se empleó el método Neighbor-Joining y un test de Bootstrap de 500 réplicas. Se muestra el dendrograma más ajustado. Las distancias evolutivas se computaron mediante el método de 2 parámetros de Kimura. A la derecha, en bloques de color, se indican los secuenciotipos plasmídicos y los correspondientes complejos clonales. El asterisco en la tabla indica la presencia de operones.

En primer lugar, se vio que el genoma *core* (o genoma central) estaba constituido por el 17% de los genes detectados (n=45). Al respecto, es posible que exista una subestimación del número de genes que constituyen el genoma *core* de estos plásmidos, ocasionada por los programas de anotación automática; sin embargo, al graficar el número total de genes y el de genes conservados en función del número de plásmidos incluidos en el análisis es posible apreciar que ya se ha alcanzado un valor asintótico para los genes conservados, y que la inclusión de más plásmidos al estudio no va a modificar dicho valor (Fig 59 A).

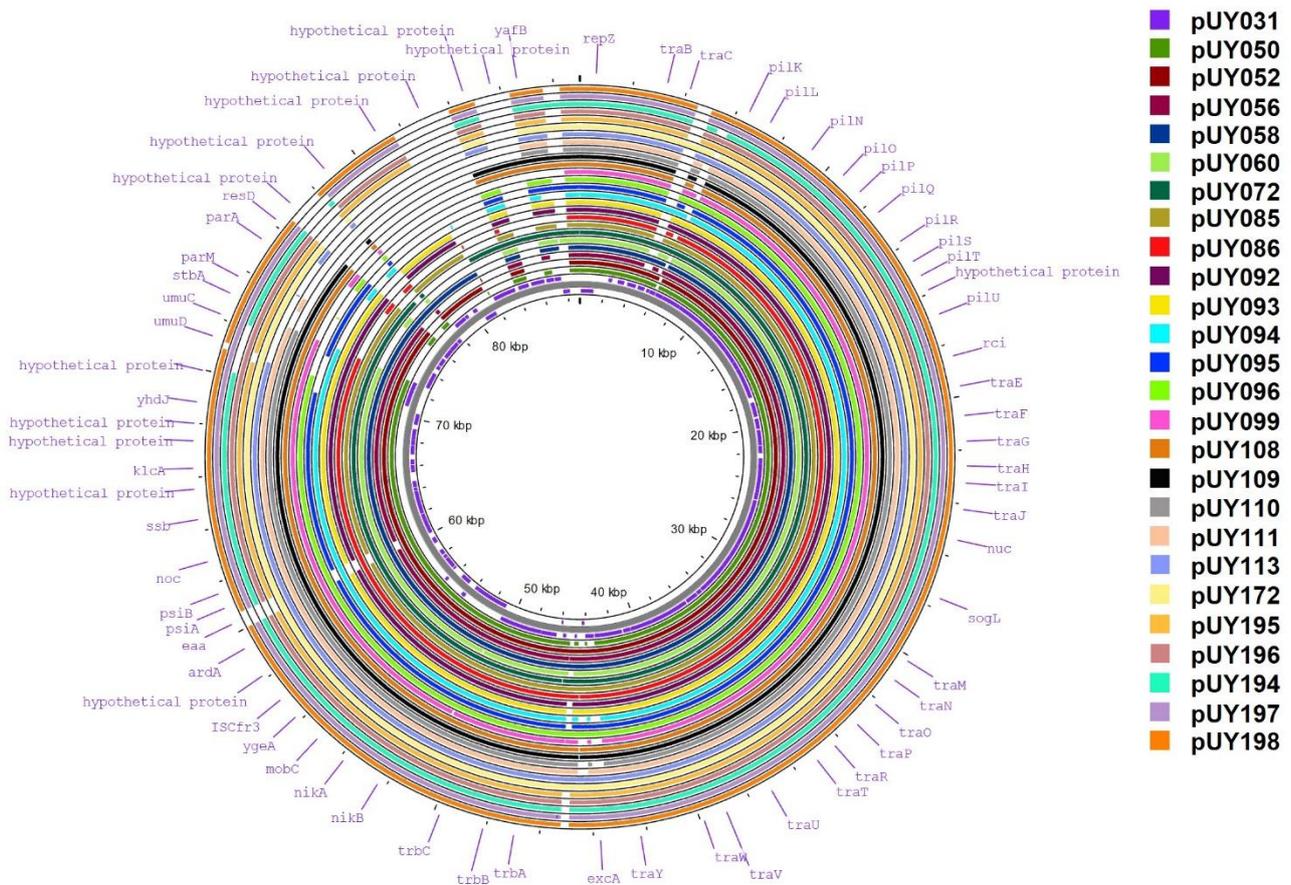


Figura 58. Alineamiento nucleotídico y sintenia de plásmidos IncI1. Los distintos plásmidos se representan como círculos concéntricos, en los cuales los segmentos de color indican regiones de homología. Los genes anotados corresponden al plásmido pUY031. Imagen generada en el sitio <https://proksee.ca/>.

A su vez, la anotación funcional de los genes *core* mostró que éstos abarcan funciones relacionadas a la replicación, estabilidad y transferencia conjugativa; por tal motivo, sería esperable encontrar un bajo nivel de variabilidad ya que cualquier alteración podría conllevar efectos deletéreos para el plásmido. No obstante, se encontraron algunas variaciones en regiones vinculadas a la transferencia conjugativa y partición/mantenimiento; en este contexto, 19 de los plásmidos carecían del gen *traD*, que a pesar de formar parte del aparato regulatorio del *pilus* conjugativo rígido, su función es desconocida y más aún, la ausencia de dicho gen en plásmidos IncI1 ya ha sido reportada (Sampei G, et al., 2010). Del mismo modo, los plásmidos IncI1 poseen un operón que codifica para un *pilus* flexible de tipo IV, compuesto por 14 genes (*pill* a *pilV*); de éstos, solo 12 parecen ser necesarios para la formación del *pilus* conjugativo, desconociéndose la posible función de los genes *pill* y *pilJ* (Yoshida T, et al.,

1999). Así, en siete de los plásmidos Incl1 se detectó la ausencia del gen *pill*. Otra fuente de variación, también vinculada a la síntesis de este *pilus* flexible, fue detectada a nivel de la maquinaria que codifica para el extremo distal de la adhesina PilV; ésta recibe el nombre de *shufflón*, y es un sistema de inversión múltiple compuesto por una recombinasa (codificada por el gen *rci*) y cuatros segmentos de ADN, separados por siete sitios de recombinación que permiten la potencial formación de siete variantes de la adhesina PilV (Gyohda A, et al., 2004). En tal sentido, en nuestros plásmidos Incl1 se hallaron múltiples rearrreglos de tales segmentos de ADN, tanto en localización como en orientación; asimismo, también se encontró deleciones de uno, dos o tres de dichos segmentos. Ambos fenómenos (reordenamientos y deleciones) han sido previamente descritos, y son justamente consecuencia de eventos de recombinación mediada por el gen *rci* (Brouwer MSM, et al., 2019). Con relación a los genes de estabilidad plasmídica, todos los plásmidos portaban el sistema toxina-antitoxina *pndAC*; sin embargo, como puede apreciarse en la tabla 3, todos los plásmidos que portaban el gen *bla_{CMY-2}*, presentaron además otros dos sistemas TA, *ccdAB* y *yacAB*; curiosamente, otros plásmidos pertenecientes al mismo secuenciotipo (pST12, cc12) que los anteriores, solo presentaban los sistemas *pndAC* y *yacAB*. Asimismo, el sistema TA *ccdAB* también fue detectado en un plásmido, perteneciente al novel pST339, que no portaba genes RAM. En tal sentido, la búsqueda de asociaciones entre la presencia del gen *bla_{CMY-2}* y la presencia del sistema TA *ccdAB*. Así, el análisis mostró la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre ambos ($p < 0.001$). En otro orden, no se encontró otras asociaciones estadísticas entre serovar, origen de la muestra, secuenciotipo o grupo clonal, con el número y/o tipo de sistema TA portados.

En otro orden, el genoma accesorio estaba constituido por el 83% restante de los genes identificados ($n=220$) (Fig. 59 B). De manera esperable, la mayor variabilidad genética entre los plásmidos Incl1 estudiados, se observó a este nivel. Así, dentro de los genes “accesorios” podemos diferenciar los de función desconocida o proteínas hipotéticas, por un lado, y por otra parte los de función conocida. Dentro de los últimos se destacan un conjunto de genes

que le ofrecen ventajas adaptativas ante distintas condiciones adversas, como ser: a) genes codificantes de colicinas que permitirían disminuir la competencia microbiana; así en 15/26 plásmidos se detectaron genes que codifican para bacteriocinas, más específicamente colicina Ia (n=14) y colicina Va (n=1); b) genes vinculados a la reparación del ADN ante la acción de agentes mutagénicos, como *impABC* (n=21); c) sistemas TA adicionales a *pndAC*, como ser *yacAB*, *ccdAB* y *relE/parE*, entre otros; y d) un conjunto variable de genes de resistencia a antibióticos, operones vinculados a la resistencia a metales pesados como plata y cobre (*cusABFCRS*, *pcoABCDER* y *silEP*). Dada la importancia clínica de estos genes se describirán en más detalle a continuación. Dieciséis de los 26 plásmidos IncI1 presentaron genes de resistencia a: β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos o a sulfonamidas. Dentro de las β -lactamasas, *bla*_{TEM-1} fue hallada en seis plásmidos, *bla*_{OXA-9} estaba presente en tres plásmidos, *bla*_{CMY-2} fue encontrada en cuatro plásmidos, *bla*_{SHV-2} en dos plásmidos, *bla*_{CTX-M-8} en dos plásmidos y *bla*_{CTX-M-14} en un solo plásmido. Mayoritariamente, se encontró una sola β -lactamasa por plásmido, aunque también se vieron combinaciones de tales genes en el mismo EGM (*bla*_{TEM-1}/*bla*_{OXA-9} [n=3], *bla*_{TEM-1}/*bla*_{CTX-M-14} [n=1]). Con relación a las demás familias de antibióticos, se detectaron los tándems *ant(3'')-Ia/aac(6')-Ib* (n=3) y *ant(3'')-Ia/aac(3)-Vla* [n=1], confiriendo resistencia a aminoglucósidos, así como el gen de resistencia a macrólidos *ermB* [n=2], y el gen de resistencia a sulfonamidas *sul1* [n=1]. Por otro lado, y en línea con lo mencionado por otros autores, estos genes de resistencia estaban insertos en la misma región cartográfica de los plásmidos, entre un área de genes hipotéticos y los genes de estabilidad *stbAB-resD* (Partridge SR, et al., 2018). El entorno genético de todos estos genes fue detallado en las anteriores secciones.

Por último, se evaluó la similitud de los plásmidos IncI1, pero empleando a tal fin la matriz de presencia/ausencia de genes generada por el programa Roary para crear un nuevo dendrograma (Fig. 59 C).

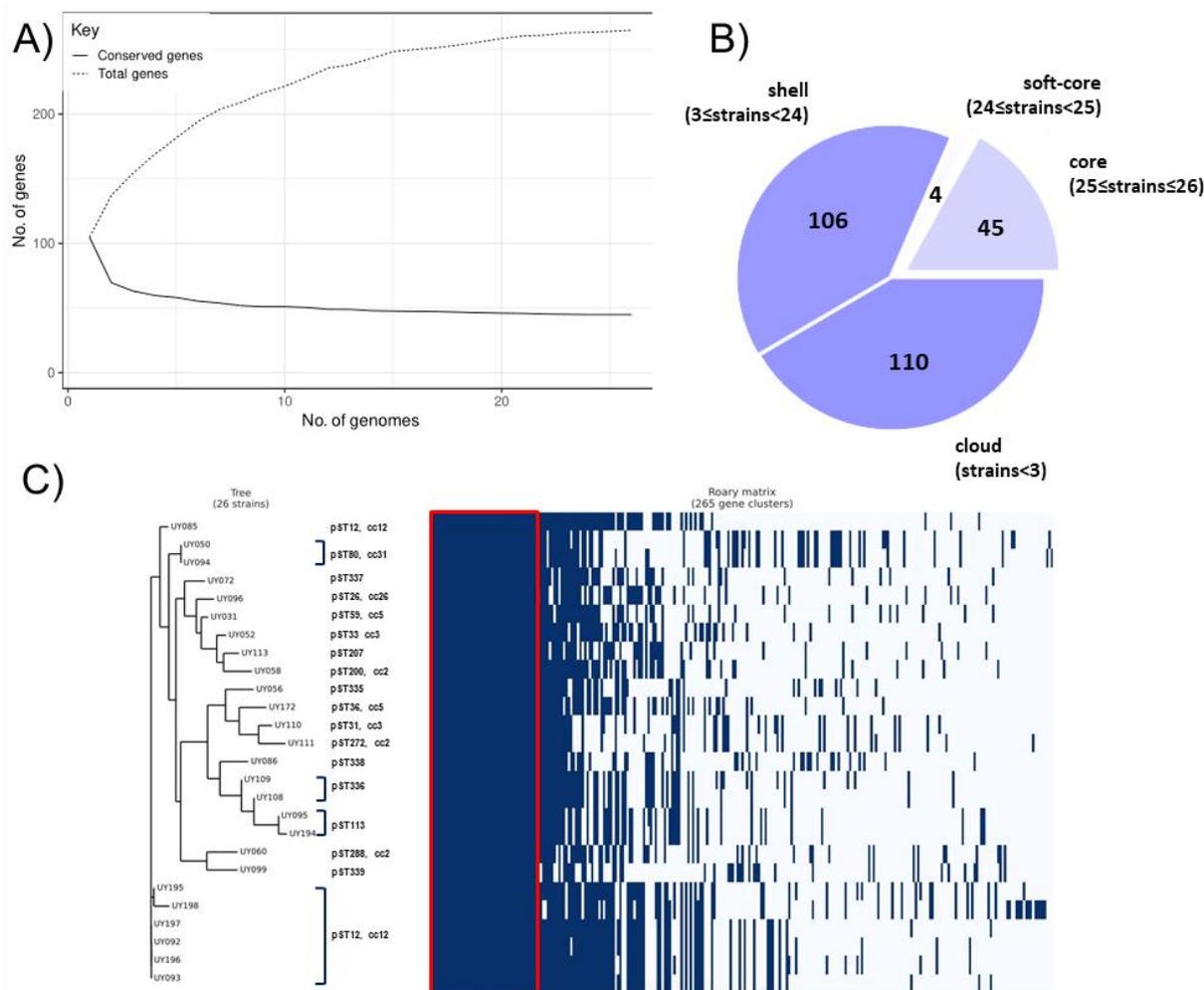


Figura 59 Resultados del análisis del pangenoma de los plásmidos IncI1. Panel A) Curva de rarefacción del genoma central y accesorio, en la cual es posible apreciar que si a medida que se incluyen más plásmidos al análisis el número de nuevos genes (accesorios) continúa aumentando, pero no sucede así para el genoma central. Panel B) Gráfico circular mostrando la composición del pangenoma plasmídico. Los genes centrales (*core genes*) están presentes en el 100% de los plásmidos analizados; los genes del núcleo blando (*soft-core*) aparecen en el 95-99%; los genes de cubierta (*shell genes*) aparecen en el 15-94%, y los genes de la nube (*cloud genes*) se detectan en menos del 15% de la muestra. La suma de los genes *soft-core*, *shell* y *cloud* constituyen el genoma accesorio. Panel C) De izquierda a derecha dendrograma del pangenoma plasmídico y matriz de presencia / ausencia de genes. Cada columna corresponde a un gen y cada fila corresponde a uno de los 26 plásmidos. Los bloques azules representan la presencia de un gen en un plásmido, mientras que los espacios blancos indican ausencia. El recuadro rojo indica el genoma central ó genoma *core*.

En tal sentido, se aprecian algunas similitudes entre éste y el presentado en la figura 57 (construido a partir de los perfiles alélicos del esquema pMLST); específicamente, pese a las diferencias en la estructura global del dendrograma, el patrón de agrupamiento de los distintos plásmidos parece conservarse. Así, casi todos los plásmidos pertenecientes al secuenciotipo pST12 siguen agrupados, a excepción pUY085; de manera interesante, este último es el

único plásmido perteneciente a dicho secuenciotipo carente de genes RAM. Por otro lado, los plásmidos pertenecientes a los secuenciotipos pST113 y pST336, siguen manteniéndose cercanamente relacionados, aunque en el nuevo dendrograma el plásmido pUY086 (en lugar de pUY056) es el que se agrupa en este conjunto; de manera interesante, tanto pUY086 como pUY056, pertenecen a secuenciotipos de reciente designación (pST338 y pST335, respectivamente). De manera similar a lo observado en la figura 57, en este nuevo dendrograma aquellos plásmidos pertenecientes a un mismo grupo clonal, pero con distinto pST, tampoco se agrupan en un mismo *cluster*. Así, por una parte, los plásmidos pUY072 (pST337), pUY096 (pST26, cc26), pUY031 (pST59, cc5), pUY052 (pST33, cc3), pUY113 (pST207) y pUY058 (pST200, cc2), y por otro lado los plásmidos pUY056 (pST335), pUY172 (pST36, cc5), pUY110 (pST31, cc3) y pUY111 (pST272, cc2) continúan agrupándose entre sí, independientemente de la data empleada para inferir la filogenia. En tal sentido, sería necesario el desarrollo de herramientas de subtipificación plasmídica que posean un mayor poder de discriminación que la ofrecida por el esquema pMLST.

7.6 Plásmidos de multiresistencia

7.6.1. Plásmido pUY094_N

El plásmido designado como pUY094_N presentó un tamaño de 62,060 pb, y tenía un contenido G+C 51.2%. Dicho plásmido codificaba para 77 marcos abiertos de lectura (ORFs) putativos y un único ARN no codificante (ncRNA). El análisis de replicones mostró que pUY094_N pertenecía al grupo de incompatibilidad N (IncN), y el estudio de pMLST (https://pubmlst.org/bigsdbs/db=pubmlst_plasmid_seqdef) lo asignó al secuenciotipo plasmídico 5 (pST5). El esqueleto del plásmido pUY094_N era muy similar a otros plásmidos de tipo IncN, abarcando aproximadamente 42,000 pb e incluía el replicón *repA* y los iterones de unión a RepA, los genes *mucAB* de protección a rayos UV, los genes antirestricción *ardAB*

y *ardKR*, los genes *ccg* (*ccgEIII*, *ccgD*, *ccgAI* y *ccgAII*), así como el operón de estabilidad plasmídica (*stbABC*) y dos loci de transferencia (*tra*).

Por otra parte, la región variable de este plásmido tenía un tamaño de 19,500 pb, que incluían a los genes de resistencia y varios elementos genéticos móviles (EGM). En tal sentido, los genes de resistencia estaban distribuidos en tres módulos, insertos en loci previamente designados como “hot spots” para la integración de EGM (Carattoli A, et al., 2010; Li JJ, et al., 2014). El primer módulo estaba ubicado entre los genes *repA* y *uvpI* y comprendía los genes de *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CTX-M-14}. Este módulo estaba flanqueado por IS26 a ambos lados, aunque en orientaciones opuestas (enfrentadas). Corriente arriba de *bla*_{TEM-1} se encontró una copia trunca del gen *tnpR*, sugiriendo que esta β-lactamasa había sido reclutada de un transposón Tn3. Corriente abajo se hallaba presente una proteína hipotética carente de dominios aminoacídicos reconocidos y una presunta proteína asociada a quimiotaxis. Por otra parte, *bla*_{CTX-M-14} estaba flanqueada corriente arriba por ISEcp1 (interrumpida por la inserción de IS10) y, corriente abajo, por IS903. Curiosamente, la búsqueda en Genbank de secuencias nucleotídicas similares a este bloque de resistencia, mostró que el parecido más cercano correspondía a un plásmido de tipo IncI obtenido a partir de un aislamiento clínico de *E. coli* en Uruguay (Di Pilato V, et al., 2019).

El segundo módulo de resistencia estaba ubicado corriente abajo del gen *uvpI* y estaba conformado por un integrón complejo de clase 1; la primer región variable estaba conformada únicamente por *dfrA25*, seguida de *sul1* como parte del extremo 3'CS; la segunda región variable de este integrón presentaba el gen *sapA* que codifica para una proteína de transporte periplásmico, una proteína hipotética, el gen de resistencia a quinolonas *qnrB2*, el gen *pspF* (un factor de transcripción putativo) y luego el extremo 3'CS secundario (3'-CS2) que presentaba una copia trunca de *qacEΔ1*. Finalmente, delimitando a esta región 3'-CS2 se hallaba la secuencia de inserción IS15D. Este mismo integrón fue previamente reportado en p137.25, un plásmido de tipo IncN obtenido a partir de un aislamiento de *S. enterica* var. Bredeney de origen animal (Fortini D, et al. 2009), y también fue detectado en SGI1-X, una

isla genómica presente en *Proteus mirabilis*, lo que indicaría un posible origen plasmídico de esta región multidroga.

Por su parte, la tercera región de resistencia consistió en los genes *tetR* y *tet(A)* localizados entre *nuc* y *tral*, insertos a su vez en el gen de inhibición de fertilidad *fipA*, suceso que también ha sido previamente descrito en el plásmido pKPI-6 (n° de acceso AB616660) (Kayama et al., 2015) (Fig. 60).

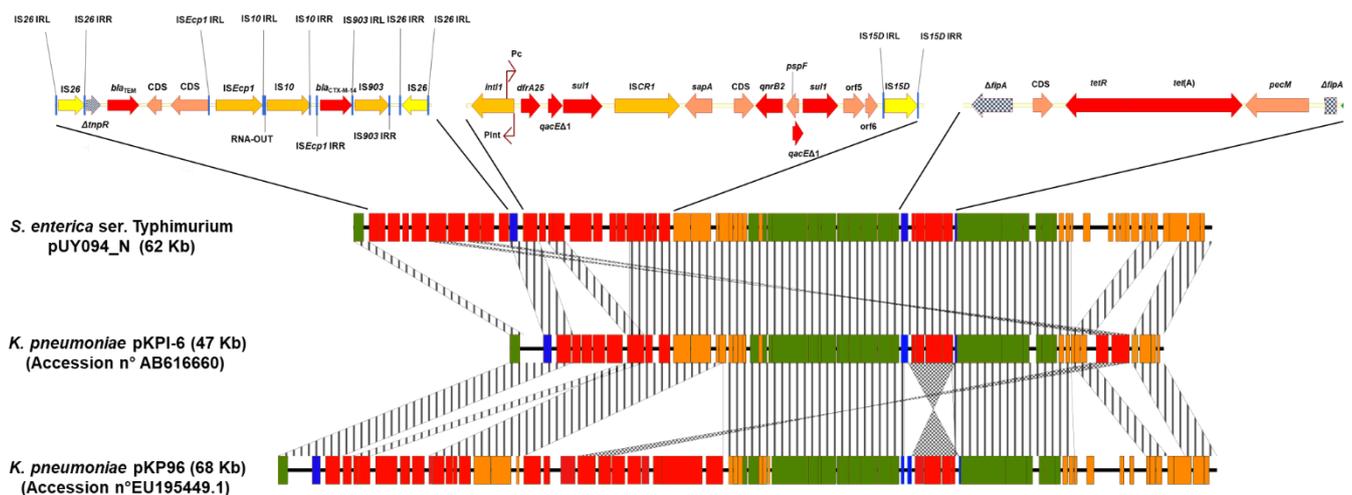


Figura 60. Entorno genético de las regiones de resistencia del plásmido pUY094_N y comparación con otros plásmidos IncN pST5. En la parte superior de la imagen los genes se representan como flechas con relleno sólido, indicando el sentido de transcripción; los genes de resistencia están representados con el color rojo, mientras que los EGM y otros genes misceláneos se representan en amarillo y naranja, respectivamente; las flechas con relleno de trama indican pseudogenes. Los promotores ligados al integrón se representan como flechas quebradas. En la parte inferior de la imagen los genes se representan como barras de color; verde) genes de replicación/estabilidad y transferencia conjugativa, azul) zonas “calientes” de recombinación, rojo) genes de resistencia, naranja) genes misceláneos. Las regiones homólogas (identidad $\geq 99\%$) se muestran como bloques a rayas, y las inversiones de ADN aparecen como bloques reticulados

Hasta la fecha, se han descrito 24 secuenciotipos para plásmidos de tipo IncN (<https://pubmlst.org/organisms/plasmid-mlst/> - 13/02/2025), siendo pST1 y pST11 los más prevalentes. Con relación al secuenciotipo 5, dicha base de datos posee únicamente 3 registros, de los cuales uno solo codifica para BLEE (*bla*_{CTX-M-24}), aunque Kayama y cols. (2015), han descrito la existencia de otro plásmido IncN pST5 portando los genes *bla*_{IMP-6} y *bla*_{CTX-M-2}. No obstante la presencia de *bla*_{CTX-M-14} en plásmidos de tipo IncN es poco frecuente y se ha reportada en China y Corea (Liao XP, et al., 2015; Song W, et al., 2011). En este

sentido esta representa la primera detección de esta β -lactamasa, junto con *qnrB2*, en este tipo de plásmidos en nuestro subcontinente.

7.6.2. Plásmido pUY094_I

El plásmido pUY094_I mostró pertenecer al grupo de incompatibilidad IncI1 y presentaba un tamaño de 96,476 pb y su contenido G+C fue de 49.3%, ligeramente inferior al G+C% de *Salmonella* sp., lo que sugeriría una reciente ganancia de tal EGM. El número de ORFs putativos fue de 115, y además se detectaron 3 ncRNA (un inhibidor de la síntesis de la proteína RepZ, un ARN antisentido designado C4, y *sok*, un ARN con función de antitoxina. Por su parte, el análisis de pMSLT mostró que pUY094_I pertenecía al secuenciotipo pST80, complejo clonal CC31. Al igual que otros plásmidos IncI1, la región de replicación de pUY094_I presentaba un gen *repZ* que codifica para una proteína de inicio de replicación, un regulador positivo (*repY*) y un ARN antisentido (*inc*) que participa en regular la expresión de *repZ*; corriente arriba de esta región se encontró una secuencia de 22pb rica en AT que constituye la señal de terminación de la replicación (*ter*). El origen de replicación u oriV, mostró cuatro cambios nucleotídicos con relación a los plásmidos considerados como prototipos de IncI1 (R64, n° acceso AP005147.1, y Collb-P9, n° acceso AB021078). Por otra parte, se encontraron varios genes vinculados a la estabilidad plasmídica, los genes *parAB* (encargados de la partición de plásmidos replicados), el gen *ibfA* (infección abortiva del fago BF23), y también los sitios *resD* y *rfsE*. En tal sentido, Gerdes y cols. señalaron que el gen *resD* se cotranscribe con los sistemas toxina-antitoxina adyacentes *ccdAB* (Gerdes K, 2000), sin embargo, ni *ccdAB* ni el sistema *yacAB* estaban presentes en pUY094_I; de hecho, el único sistema toxina-antitoxina detectado en este plásmido fue *pndAC*. Asimismo, se detectó un par de genes, designados como *stbA* y *stbB*, que de acuerdo con la base de datos PFAM (<http://pfam-legacy.xfam.org/>), corresponden a proteínas putativas de estabilidad plasmídica. Por otra parte, la región de transferencia de pUY094_I estaba organizada de manera similar a la de plásmidos como R64 y R621a (Sampei G, et al., 2010; Takahashi H, et al., 2011), es

decir: i) los genes regulatorios *traABC*, ii) los genes codificantes para el pilus de tipo IV (*pil*), iii) los genes de conjugación *tra/trb*, y iv) un operón *oriT* responsable por introducir cortes en ADN plasmídico, formación del relajasoma y el anclaje de este al sistema de secreción de tipo IV (Norman A, et al., 2009).

La “región” de resistencia en pUY094_I estaba localizada entre el gen *resD* y el sitio *rsfF*, y estaba compuesta por el gen de resistencia a macrólidos *ermB* y su regulador *ermBL*. Estos genes estaban flanqueados a ambos lados por copias de IS26 en orientación directa. La comparación de este bloque contra la base de datos nucleotídica del sitio NCBI mostró que el hit más cercano correspondió al plásmido pUR-EC07 (MH674341.1), aunque las copias flanqueantes de IS26 en este último se encontraban en dirección divergente (Fig. 61).

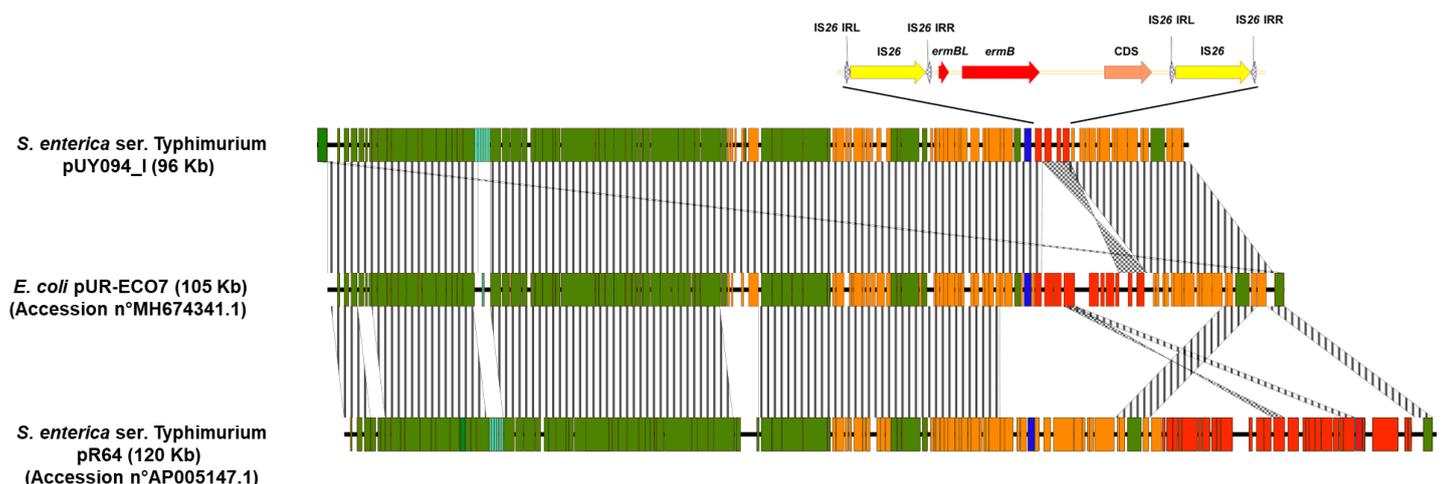


Figura 61. Región de resistencia del plásmido pUY094_I y comparación con otros plásmidos Incl pST80. En la parte superior de la imagen se muestra el entorno genético de *ermB*. Los genes se representan como flechas de color, e indican el sentido de transcripción; en rojo se muestran los genes de resistencia; los EGM y genes misceláneos se muestran en amarillo y naranja, respectivamente. En la parte inferior de la imagen se muestra la comparación entre plásmidos, en la cual los genes se representan como barras coloreadas: en verde) genes de replicación/estabilidad y transferencia conjugativa; en azul) zonas “calientes” de recombinación; en rojo) genes de resistencia antibiótica; en naranja) genes misceláneos. Las regiones de homología (identidad $\geq 99\%$) se muestran como bloques a rayas, y las inversiones aparecen como bloques reticulados.

Si bien el género *Salmonella* es intrínsecamente resistente a eritromicina, gracias a la expresión de bombas de eflujo, por lo general dicho microorganismo suele ser susceptible a azitromicina. No obstante, la resistencia adquirida a macrólidos suele ser mayoritariamente debido a mutaciones en genes que codifican para ARN ribosómico (Gunnell M, et al., 2010).

La presencia del gen *ermB* en *Salmonella* no tifoidea no es muy frecuente, y la mayoría de los reportes en bases de datos corresponden a aislamientos, ya sea de origen clínico en Asia y recientemente en Europa (Liu M, et al., 2023; Chiou CS, et al., 2023; Vázquez X, et al., 2024), o de aislamientos de origen animal en Europa (Ivanova M, et al., 2024; Alba P, et al., 2020). De manera interesante, en el continente americano, además del único reporte clínico de *S. Typhimurium* portando *ermB* (junto con otros genes de resistencia), realizado por nuestro grupo de trabajo (Cordeiro N, et al., 2019), también se ha documentado la presencia de dicho gen en *Salmonella* *Infantis* aislada de muestras de carne ingresada ilegalmente a Brasil desde Argentina y Uruguay (Gonçalves Pereira J, et al., 2020). En tal sentido, se presume que los aislamientos de *Salmonella* provendrían de Argentina; sin embargo, no se proporciona información sobre el entorno genético de *ermB* ni el plásmido en el que se encuentra.

Por otra parte, la presencia del gen *ermB* en Enterobacterales ya había sido reportada en Uruguay. En este contexto, Di Pilato y cols. describieron un plásmido de tipo IncI1, aislado de *E. coli* en 2010, y perteneciente al secuenciotipo pST80 (pUR-EC07), que portaba los genes *bla*_{CTX-M-14} y *ermB* (Di Pilato V, et al., 2019). La comparación entre dicho plásmido y pUY094_I mostró que a pesar de que ambos plásmidos compartían el mismo esqueleto, las regiones de resistencias mostraban diferencias significativas; así, el transposón designado como Tn6652 en pUR-EC07 está ausente en pUY094_I, mientras que, si bien Tn6651 está presente en pUY094_I, dicho EGM se encuentra invertido con relación al plásmido pUR-EC07.

Del mismo modo, existe también una llamativa similitud entre la región de resistencia a β -lactámicos del plásmido pUY094_N, la región de resistencia a macrólidos de pUY094_I, y la región de resistencia del plásmido pUR-EC07 (Tn6652 y Tn6651, respectivamente). Asumiendo que pUR-EC07 se trata del plásmido ancestral, un escenario probable podría ser a) primeramente, la transferencia de Tn6652 como unidad transponible, mediante un mecanismo de transposición replicativa entre pUR-EC07 y una copia preexistente de IS26

localizada en el plásmido IncN (Harmer CJ, et al., 2014); y eventualmente b) un evento de transposición intramolecular en trans, originando la inversión de Tn6651 (He S, et al., 2015).

7.6.3 Plásmido pUY192_H

Como se mencionó anteriormente, el plásmido pUY192_H fue detectado en una cepa de *S. Typhimurium* aislado a partir de un coprocultivo obtenido de un paciente del hospital pediátrico Pereira Rossell durante el 2016. Dicho plásmido, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncHI2A/HI2, mostró un tamaño de 315,665pb, su contenido G+C fue de 46.8%, y codificaba para 389 ORFs putativos (sin incluir pseudogenes ó genes truncados). El análisis de pMLST indicó que este plásmido pertenecía al secuenciotipo pST1. En tal sentido, plásmidos IncHI2 pertenecientes a este secuenciotipo han sido previamente identificados a partir de patógenos de origen humano, animales de compañía, pollos y cerdos (Chowdhury PR, et al., 2019). El alineamiento de pUY192_H con otros plásmidos pST1 mostró un esqueleto altamente conservado, asociado mayoritariamente a genes implicados en la replicación, estabilidad plasmídica, transferencia conjugativa y segregación, entre otros. En tal sentido, el plásmido pUY192_H portaba numerosos genes asociados a resistencia a metales pesados como arsénico, cobre, mercurio, níquel y telurio, lo cual le conferiría una ventaja adaptativa (sobrevivida en el medio ambiente) a la cepa que portaba este plásmido debido al uso de metales pesados para el control ambiental de poblaciones microbianas (Deng W, et al., 2018). Por otra parte, este plásmido contenía una isla de resistencia de aproximadamente 56 Kb, la cual incluía 19 genes de resistencia antibiótica que conferían resistencia frente a siete familias distintas de antibióticos: β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, rifamicinas, fenicoles, quinolonas, e inhibidores de la vía de la síntesis del folato. Así, en sentido 5'-3', la resistencia a tetraciclinas estaba codificada por los genes *tet(A)* y su regulador *tetR*, flanqueados a ambos lados por dos copias de IS26 en orientación divergente. Corriente abajo y separado por unos 6 Kb, se encontró un integrón de clase 1 cuya región variable estaba formada por los genes *cassette aac(6')-Ib-cr*, *arr3*, *dfra27* y *aadA16*, seguida por un extremo 3'CS clásico

(*qacEΔ1* y *sul1*). La búsqueda de integrones similares en la base de datos Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), indicó que dicho arreglo génico fue encontrado por primera vez en plásmido presente en *Serratia rubidea* en China (pLC108, sin publicación asociada). Inmediatamente corriente debajo de este integrón se encontró el gen de resistencia a quinolonas *qnrB1*; el mismo estaba bordeado, corriente arriba por una copia de IS26 y un ORF que codificaba para una oxidorreductasa putativa, y corriente abajo por una IS3000, un par de ORFs putativos y otra copia de IS26 en igual orientación que la primera. A continuación, se encontró una copia del transposón Tn5403 (transposasa y su respectiva resolvasa) interrumpiendo la transposasa del TnAS1, otra copia de IS26 seguida de los genes *aac(6)-Ib-cr6* y *bla_{OXA-1}*; estos a su vez se continuaban por IS26 (orientada convergentemente en relación a la copia anterior), el gen de resistencia a aminoglucósidos *aacC3*, una presunta proteína de resistencia a tunicamicina, *ISKpn11* y otra copia de IS26 interrumpiendo el extremo 3' de la transposasa de Tn3. Luego, se encontró el gen de la BLEE *bla_{CTX-M-15}* seguida de *ISEcp1*, insertos en el extremo 5' de Tn3; estos se continuaban por la resolvasa de Tn3, otra copia de IS26, y los genes de resistencia *bla_{TEM1}*, *aph(6)-Ia*, *aph(3'')-Ib* y *sul2*; flanqueando a este último, se hallaban IS5075, y un fragmento de TnPa38 truncado por la inserción de otra copia de IS26. Por último, se encontró otro integrón de clase 1, que carecía del extremo 3'CS, cuyo único gen *cassette* era *aadA*; éste se continuaba por el gen de resistencia a cloranfenicol *catA1*, flanqueado por dos copias de IS1 (Fig. 62). El alineamiento de toda esta isla de resistencia contra bases de datos nucleotídicas arrojó resultados parciales. Así, los dos hits más cercanos correspondían a plásmidos del mismo grupo incompatibilidad y secuenciotipo que pUY192_H. En tal sentido la isla de resistencia presente en el plásmido pCRENT-139_1, obtenido de un aislamiento de *E. hormaechei*, mostró una isla de resistencia bastante similar en estructura, pero la principal diferencia radicaba en la conformación del primer integrón, que presentaba como único *cassette* al gen *dfrA14*, careciendo además del extremo 3'CS. La siguiente diferencia era la presencia en pCRENT193_1 del pseudogen Δ *CatA1* entre los genes *bla_{OXA-1}* e IS26. Asimismo, la isla de

resistencia presente en el plásmido pEh9_1, obtenido de un aislamiento de *Enterobacter* sp. resultó ser igual a la descrita en pCREN-193T_1, aunque la misma se encontraba en sentido inverso con relación a la anterior (Fig. 62).

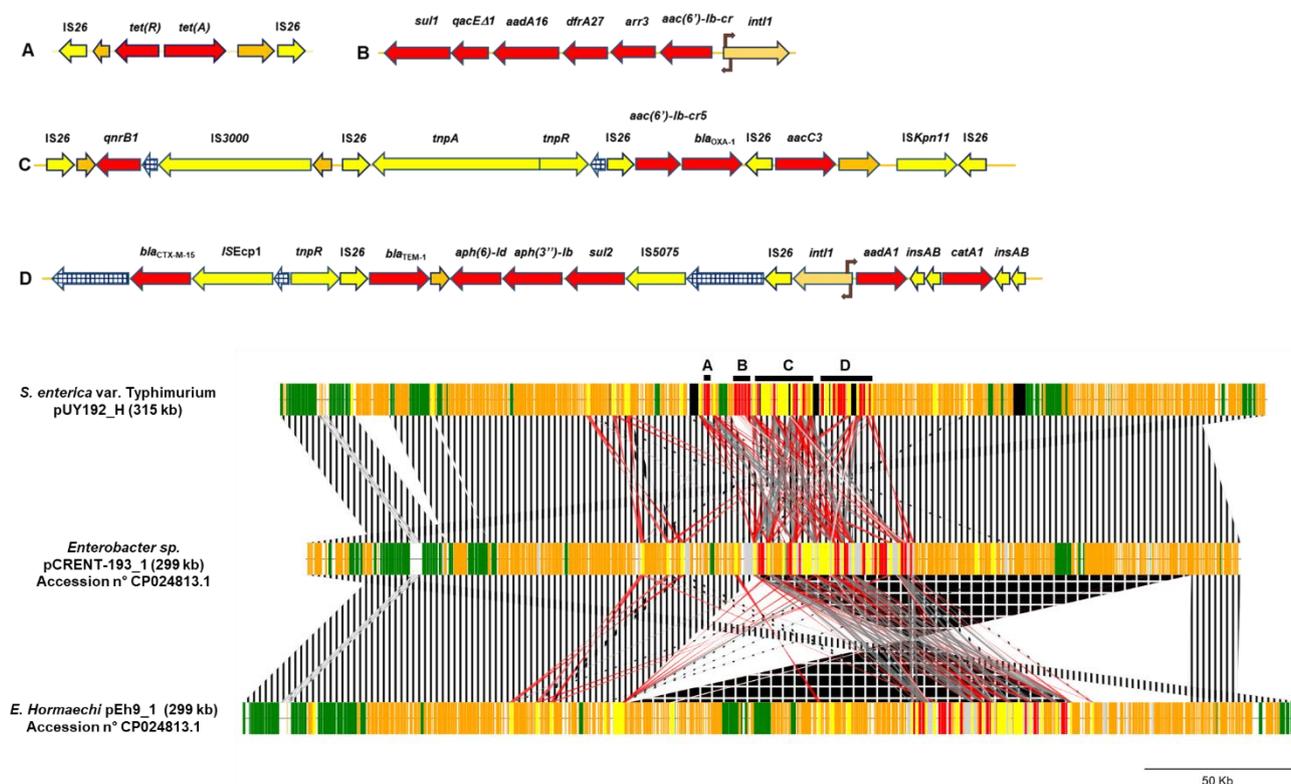


Figura 62. Isla de resistencia del plásmido pUY192_H y comparación con otros plásmidos IncHI2A pST1. En la parte superior de la imagen se muestra la isla de resistencia subdividida en 4 sectores, con su correspondencia en la parte inferior de la imagen (barras horizontales negras). Los genes se representan como flechas coloreadas, indicando el sentido de transcripción; en rojo se representan los genes de resistencia, en amarillo los EGM, en naranja genes misceláneos y ORFs hipotéticos, en beige los genes de las integrasas, y las flechas reticuladas corresponden a pseudogenes / genes truncos. Las flechas quebradas representan los promotores asociados a las integrasas y sus correspondientes sentidos de transcripción. En la parte inferior de la imagen se muestra la comparación nucleotídica entre plásmidos. Las barras verticales coloreadas representan los distintos genes/ORFS; en rojo) genes de resistencia antibiótica; en naranja) genes varios; en verde) genes asociados a replicación, estabilidad, partición y transferencia conjugativa; en negro y gris) pseudogenes / genes truncos. Los bloques a rayas corresponden a regiones con identidad $\geq 99\%$; los bloques rojos, regiones con identidad $\sim 77\%$, y el bloque reticulado corresponde a inversiones de ADN.

7.6.4. Plásmido pUY193_C

El plásmido designado en la presente tesis como pUY193_C fue identificado a partir de una cepa de *S. Enteritidis*, aislada en el año 2022 a partir del urocultivo de un paciente que previamente había estado internado por un periodo prolongado por COVID-19. Dicho plásmido pertenecía al grupo de incompatibilidad IncC de tipo 2, y mostró un tamaño de

aproximadamente 168 Kb; su contenido G+C fue 52,8% y codificaba para 210 ORFs. De acuerdo con el análisis de pMLST, este plásmido muestra modificaciones no reportadas previamente en los alelos *repA* y *parB*, lo que sugiere que podría representar un nuevo secuenciotipo. En este sentido, el perfil alélico más cercano identificado fue pST5. El esqueleto de pUY193_C abarcaba 122.8 Kb, lo cual es ligeramente inferior a plásmidos similares encontrados en Uruguay (Papa-Ezdra R, et al., 2021). No obstante, pUY193_C albergaba todos los genes necesarios para la replicación, mantenimiento, partición y transferencia conjugativa. De manera interesante, si bien los plásmidos de tipo IncC presentan tres copias del gen *dcm* (metiltransferasa), pUY193_C carecía de *dcm1*, probablemente debido a un evento de delección vinculado a la isla de resistencia ARI-B. De todos modos, este fenómeno ha sido reportado previamente, y no conllevaría efectos deletéreos para el plásmido (Harmer CJ, et al., 2015b).

El alineamiento de pUY193_C con otros plásmidos IncC de tipo 2 mostró que el mayor parecido correspondía a pEc8791 (n° acceso MZ465532), obtenido de un aislamiento clínico de *E. coli* recuperado en Argentina. Sin embargo, los genes de resistencia a β -lactámicos y a fluoroquinolonas portados por este último (*bla*_{PER-2} y *aac(6')-Ib-cr*, respectivamente) diferían de los detectados en pUY193_C (ver más adelante); otra diferencia importante fue la ausencia en pEc8791 de todo el operón de resistencia a mercurio y del gen *chrA*, que codifica para un transportador de cromato. El siguiente plásmido en similitud, correspondió a pEC8-NDM (n° acceso CP060954), obtenido a partir de un aislamiento clínico de *E. coli* resistente a carbapenems recuperado en China. Al igual que pUY193_C, dicho plásmido portaba el gen *bla*_{NDM-1}, pero en un entorno genético diferente; más aún el plásmido pEC8-NDM también carecía del operón de resistencia a mercurio y del gen *ltrA* (codificante de un intrón de grupo II), localizado corriente abajo del gen de transferencia plasmídica *traC* (Fig. 63). Al igual que otros plásmidos IncC de tipo 2, pUY193_C presentó dos islas de resistencia (ARI-A y ARI-B). En este sentido, ARI-B estaba insertada corriente arriba de los genes de estabilidad *parAB* y

consistía en el gen de resistencia a sulfonamidas *sul2*, precedido por un gen que codificaba para una fosfogluocosamina mutasa y por *ISCR2*.

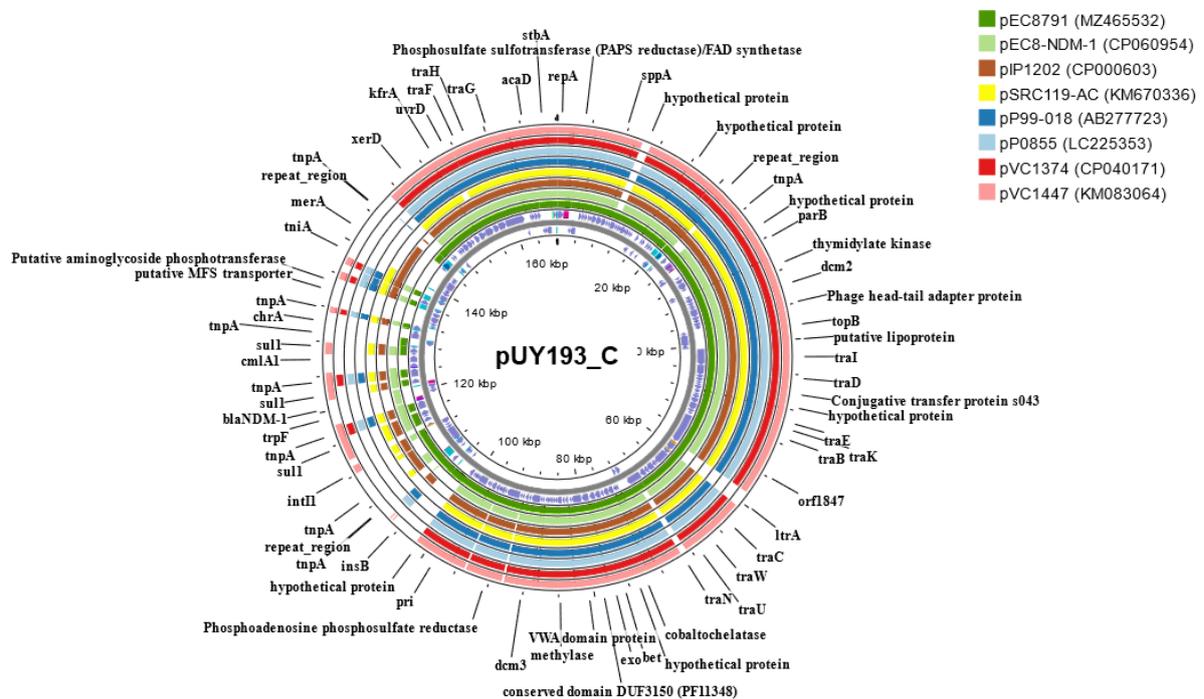


Figura 63. Alineamiento de plásmidos IncC de tipo 2. El círculo más interno corresponde a pUY193_C, con sus distintos elementos representados como flechas violetas (ORFs), bloques cian (regiones repetidas), bloques magenta (características varias). Los demás plásmidos aparecen representados como círculos concéntricos, donde los segmentos coloreados indica regiones de homología. Imagen generada con Proksee (<https://proksee.ca/>).

Por otro lado, la isla ARI-A, localizada entre los genes *pri* (primasa de ADN) y *xerD* (integrasa/recombinasa fágica), abarcaba unos 42.3 Kb y albergaba múltiples genes de resistencia a los antibióticos. ARI-A estaba conformada por un nuevo transposón derivado de Tn21 “anclado” al ADN plasmídico por la inserción de dos copias de *IS4321*, en los repetidos invertidos izquierdo y derecho del Tn21, de modo similar a como fue reportado previamente (Partridge SR, et al., 2003). Asimismo, esta nueva unidad transponible, designada como Tn7810, presentaba un tamaño de 39269pb y estaba flanqueada por dos copias de secuencias de inserción de la familia *IS1*; a su vez, delimitando dicha unidad transponible, se hallaban los repetidos directos izquierdo y derecho (5'-TAATA-3'). Corriente abajo de la primera *IS1*, se halló el gen de resistencia a cloranfenicol *catA1* y la secuencia de inserción

IS4321R (separados entre sí por un ORF putativo); adyacente a esta se halló el transposón TnAS3, con sus tres genes *tnpA*, *tnpR*, y *tnpM*. A este EGM le siguió un integrón de clase 1 complejo que presentaba dos copias de ISCR1 y dos tándems *qacE Δ 1-sul1*, dando lugar así a tres regiones variables (VR) y a dos regiones 3' conservadas (3'CS). En tal sentido, VR1 estaba conformado por los genes *dfrA12* y *aadA2*, confiriendo resistencia a trimetoprim y a aminoglucósidos, respectivamente; por otra parte, VR2 consistió en los genes *trpF*, *ble*, *bla_{NDM-1}* y *sul1*, confiriendo resistencia a bleomicina, carbapenemes y sulfonamidas, respectivamente; por su parte, VR3 presentaba los genes *qnrA1* y *cmlA1*, confiriendo resistencia a quinolonas y a fenicoles, respectivamente. Finalmente, entre este integrón complejo y el operón de resistencia a mercurio, se halló al gen de resistencia a aminoglucósidos *aph1*, flanqueado a ambos lados por dos copias de IS26 en orientación directa (mismo sentido). Si bien el gen *bla_{NDM-1}* ya ha sido descrito en plásmidos IncC de tipo 1 y 2 (pMS6192A-NDM n° acceso NZ_CP054941 y pEC8-NDM-1 n° acceso CP060954, respectivamente), el entorno genético que lo rodea en el plásmido pUY193_C resulta novedoso. En este contexto, el análisis de homología nucleotídica de todo este EGM reveló únicamente coincidencias parciales (Fig. 64).

Por otra parte, en plásmidos IncC de tipo 2 el sitio de inserción de la isla de resistencia ARI-A es cercano a, o dentro del gen *rhs*; sin embargo, dicho gen está completamente ausente en pUY193_C. De todos modos, dicha ausencia no sería deletérea para el plásmido ya que el gen *rhs* en sí mismo es considerado como una “zona caliente” para la inserción de islas de resistencia (Harmer CJ, et al., 2015). Si bien ya se han descrito deleciones parciales de *rhs* en plásmidos IncC de tipo 1 (Harmer CJ, et al., 2014), no existían publicaciones que hicieran mención de este tipo de eventos en plásmidos IncC de tipo 2; así el análisis de secuencias nucleotídicas disponibles en bases de datos, mostró que tanto el plásmido pEc8791, y el plásmido pEc61B (n° acceso CP053105) también carecían del gen *rhs*. De manera interesante, dichos plásmidos habían sido reportados en Argentina y Brasil, respectivamente, si bien mostraban islas de resistencia completamente distintas.

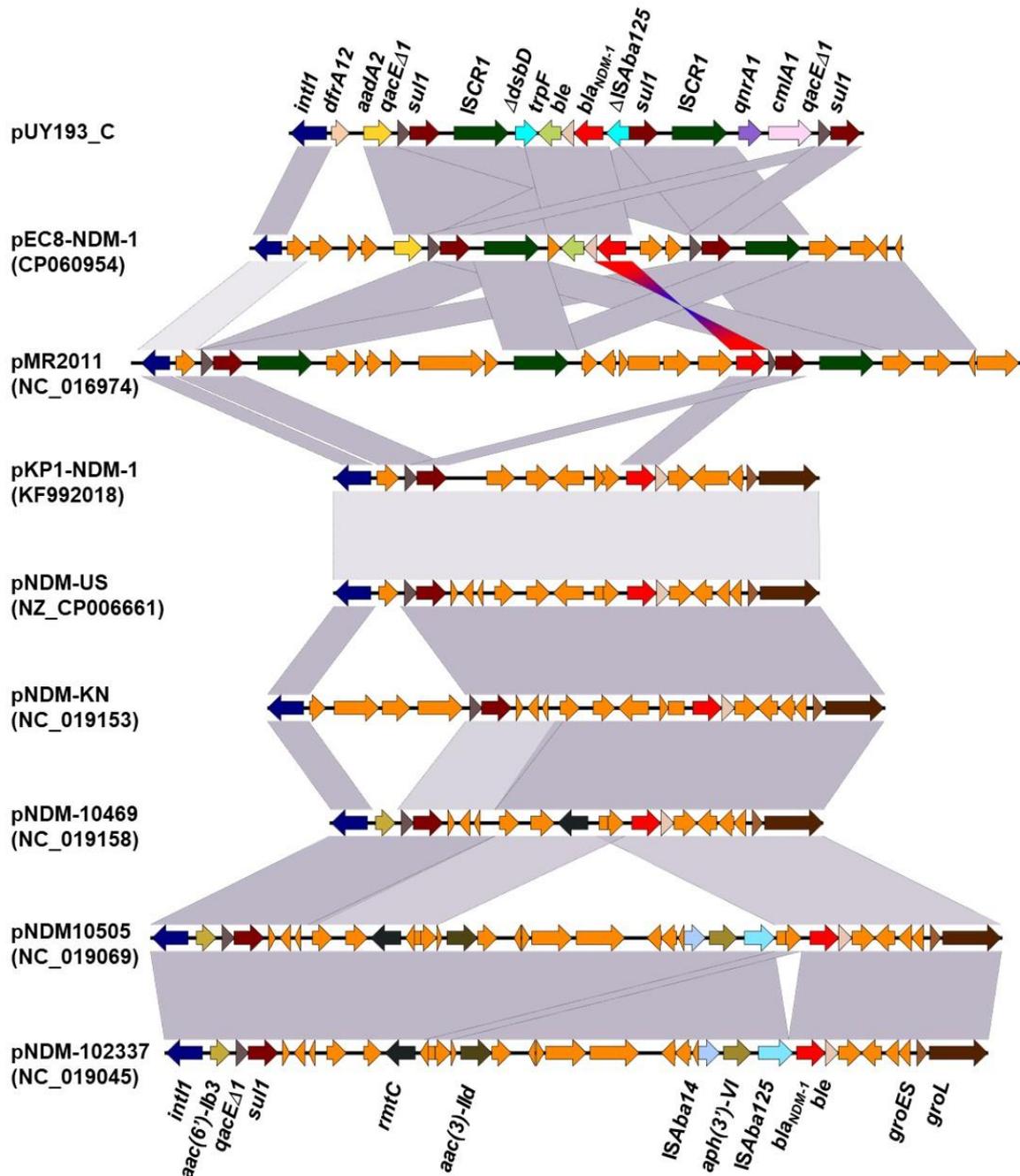


Figura 64. Alineamiento nucleotídico de la isla ARI-A, presente en pUY193_C, contra otras islas de resistencia previamente descritas en plásmidos IncC que también portaban el gen *bla*_{NDM-1}. Los segmentos homólogos están representados por bloques grises (los tonos más claros indican un menor porcentaje de identidad nucleotídica). Los genes compartidos por distintas moléculas de ADN están representados con el mismo color.

En función de ello, se hizo un análisis filogenético de la secuencia nucleotídica de los alelos empleados en el esquema de pMLST de plásmidos IncC (*repA*, *parA*, *parB*, A053); en este sentido, el dendrograma resultante mostró que el plásmido pUY193_C se agrupa con

pEc8791 y con pEc61B, dando lugar a una derivación a partir del clado IncC de tipo 2 (Fig. 65).



Figura 65. Inferencia de la filogenia de plásmidos IncC. El dendrograma está a escala y fue inferido por el método Neighbor-joining; el porcentaje de réplicas en los cuales los taxones se agruparon se muestra en las ramas (Bootstrap, 500 réplicas). El recuadro azulado corresponde a plásmidos IncC de tipo 1; el recuadro verde indica los plásmidos IncC de tipo 2; el recuadro amarillento indica el sublinaje putativo de plásmidos Inc, y la estrella corresponde al plásmido pUY193_C.

Si bien los resultados obtenidos sugieren que el plásmido pUY193_C podría pertenecer a un nuevo secuenciotipo de plásmidos IncC, aún resta la confirmación de los curadores de la correspondiente base verificar dicha suposición. Por otra parte, los resultados del ensayo de filogenia también sugieren que pUY193_C, junto a los plásmidos pEc8791 y pEc61, pertenecerían a un nuevo subtipo de esta familia de plásmidos.

8. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó el análisis de una colección 212 aislamientos de *Salmonella enterica* recuperados en Uruguay durante el periodo comprendido entre los años 1976 y 2022. Dichos aislamientos provenían de muestras clínicas, de origen animal, de alimentos y de origen ambiental. La mayoría de los genomas fueron previamente secuenciados en el Instituto Sanger del Reino Unido, y durante el transcurso de la presente tesis se realizó además la secuenciación *in situ*, mediante plataformas de lectura larga y corta, de aislamientos más recientes de dicha especie. Mediante análisis bioinformáticos se determinaron el serotipo y el secuenciotipo de los aislamientos, y se evaluó la presencia de genes de resistencia antibiótica, grupos de incompatibilidad plasmídica, genes de virulencia, y sistemas bacterianos de defensa. Además, se realizaron estudios de evolución sobre genes de resistencia con persistencia temporal, junto con análisis de genómica comparativa, pangenoma, y filogenia. Por otra parte, se caracterizó el fenotipo de resistencia en aquellos aislamientos que presentaban genes RAM, y se llevaron a cabo los análisis estadísticos correspondientes para evaluar la correlación entre genotipo y el fenotipo.

De los genomas de *S. enterica* analizados, aproximadamente el 30% correspondía al serovar Enteritidis, el 24% al serovar Typhimurium, 13.7% al serovar Derby, 10% al serovar Gallinarum, 6.6% al serovar Montevideo, 6.6% al serovar Dublín; el resto de la muestra analizada estuvo compuesta por otros serovares minoritarios (poco representados en nuestra colección). Con relación al origen, aproximadamente el 49.5% de los genomas correspondían a muestras obtenidas de aislamientos clínicos, fundamentalmente coprocultivos y hemocultivos (en una proporción de 3 a 1). Por su parte, otro 19.3% de los genomas estudiados correspondían a cepas aisladas de huevos y 17.5% fueron de origen animal (pollos en su mayoría, bovinos y ovinos, entre otros). Las cepas de origen alimentario, por su parte, constituyeron el 9.9% de los genomas estudiados e incluían, entre otros, chacinados, embutidos y harinas de origen animal.

8.1. Viruloma de *S. enterica*

El análisis bioinformático de los genes de virulencia mostró resultados interesantes, como la presencia (o ausencia) de tales determinantes de virulencia en función del serovar, así como también variaciones intra serovar. Así, en línea con lo reportado por otros autores se detectó la presencia de sistemas de secreción de tipo VI (T6SS) completos, únicamente en genomas pertenecientes a *S. Agona*, *S. Dublín*, y *S. Gallinarum* (Troxell B, 2018). El T6SS ha sido descrito como una aguja molecular similar a una cola retráctil invertida del fago T4; estudios in vitro han sugerido que el T6SS participaría compitiendo con la microbiota intestinal por la ocupación de nichos en la mucosa intestinal, y en serovares como *Gallinarum* estaría vinculada a la colonización del intestino y otros órganos en pollos (Bao H, et al., 2020). De manera interesante, también se detectó la presencia de T6SS incompletos en un aislamiento de *S. Enteritidis* y otro de *S. Livingstone*, ambos obtenidos de pollo. Asimismo, la presencia de los genes *lpfABCDE* (*long polar fimbriae*) también estuvo asociada a serovares específicos. Dichos genes codifican para estructuras fimbriales que juegan un papel importante en la adhesión, colonización intestinal y persistencia en el hospedador, sobre todo son de particular importancia en la adhesión a la mucosa intestinal y las células M de las placas de Peyer (Gonzales AM, et al., 2017). Así, este operón fue hallado en el genoma de la mayoría de los serovares, estando ausente en *S. Anatum*, *S. Cerro*, *S. Derby*, *S. Give*; *S. Montevideo*, *S. Orianenburg* y *S. Panamá*. Esto sería como resultado de eventos de adaptación de distintos serovares a nichos ecológicos específicos, llevando a la pérdida de dichos genes en la medida que los mismos ya no conferirían una ventaja selectiva (van Asten, et al., 2005). Una situación similar se pudo observar con el operón *pef* (*plasmid-encoded fimbriae*), y fue detectado únicamente en genomas de los serovares *Typhimurium*, *Enteritidis* y *Choleraesuis*. Dicho operón codifica para fimbrias flexibles carentes de adhesinas terminales, que median la adhesión a numerosas estructuras en los hospederos de *Salmonella* y también en el ambiente, y ha sido localizado en el plásmido de virulencia de *S. Typhimurium* y también en plásmidos de virulencia de *S. Enteritidis* y *S. Choleraesuis*, entre

otros (Hurtado-Escobar GA, et al., 2019). Más aún, se observó variabilidad en la presencia del operón *pef* dentro de los genomas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*; su ausencia se correspondió con la del plásmido de virulencia en tales aislamientos, demostrado por la ausencia de genes como *spvB*, *spvC* y *spvD*.

Por otra parte, en el genoma de todos los aislamientos de *S. Give*, *S. Montevideo*, *S. Orianenburg* y *S. Panamá* se detectó la presencia de los genes *cdtB*, *pltA* y *pltB*. Las proteínas codificadas por estos genes forman una toxina tifoidea tripartita, con capacidad de detención del ciclo celular en células hospedadoras (Figueredo R, et al., 2015). Dichos genes han sido detectados previamente en serovares de SNT como *Typhimurium*, *Montevideo*, *Agbeni*, *Give*, *Orianenburg*, *Schwarzengrund*, *Bredeney* y *Javaiana*, a partir de aislamientos clínicos humanos, de origen aviar, ambientales y de alimentos (Suez J, et al., 2013; Bhandari M, et al., 2023). En la colección de genomas analizados, los aislamientos portadores de *cdtB*, *pltA* y *pltB*, también fueron obtenidos de alimentos y harinas de origen animal, del ambiente (aguas residuales), de aves (pollo y huevos), de bovinos, y a partir de muestras clínicas (coprocultivos y hemocultivos). Asimismo, según nuestro conocimiento, esta sería la primera descripción de dichos genes en aislamientos de *S. Panamá*, obtenidos a partir de muestras clínicas humanas (coprocultivo) y de origen aviar (huevos), correspondiente a los años 2004 y 2002, respectivamente.

8.2. Sistemas de Defensa de *S. enterica*

El estudio de mecanismos de defensa bacterianos mostró la presencia de 1393 genes asociados a esta función en los 212 genomas analizados. Estos genes se agruparon en cuatro grandes categorías: a) degradación de ácidos nucleicos, b) depleción/modificación de nucleótidos, c) disrupción de membranas / infección abortiva y d) aquellos con mecanismos de acción diversos y/o escasamente caracterizados; en este sentido, la mayoría de los genes detectados (n=814, ~ 60%) pertenecieron a sistemas de degradación de ácidos nucleicos, y

dentro de estos, los más abundantes fueron los sistemas R-M, particularmente de tipo III y I, y el sistema CRISPR/Cas. Por otra parte, las restantes categorías se encontraban distribuidas de manera relativamente equitativa (Depleción/modificación = 194 (~14%), Disrupción/infección abortiva = 221 (~16%), Otros/desconocidos = 164 (~12%)). Nuestros datos concuerdan mayoritariamente con lo reportado por otros autores, que describen que el 61.5% de los sistemas de defensa detectados en genomas de bacterias y arqueas, funcionan a través de tal mecanismo (Tesson F, et al., 2022); en otro orden, las proporciones encontradas de los restantes sistemas varían ligeramente con lo reportado por dichos autores, correspondiendo la mayor discrepancia a la proporción de sistema de función desconocida (19.2%). En tal sentido, esta diferencia podría estar vinculada a que el trabajo de Tesson y cols. abarcaba múltiples órdenes bacterianos y arqueas, por lo que la detección de un mayor número de sistemas desconocidos sería esperable.

En general, el promedio de sistemas de defensa en nuestra colección de genomas fue ~ 6.5, similar a lo reportado para otras enterobacterias como *E. coli* (Tesson F, et al. 2022): Sin embargo, al discriminar el contenido de estos sistemas en función del serovar encontramos que a) el promedio de sistemas de defensa varía según el serovar estudiado, siendo *S. Typhimurium* el que mayor cantidad presenta (\bar{x} ~10.9), y *S. Enteritidis* y *S. Gallinarum* los de menor promedio (\bar{x} ~ 4.1 y 4.2, respectivamente); b) cada uno de los serovares con mayor representación en la muestra presentó un perfil específico de dichos sistemas. En tal sentido, Coluzzi y cols. recientemente reportaron resultados bastante similares a los nuestros; así, dichos investigadores también encontraron que, en su muestra, *S. Typhimurium* presentaba el mayor promedio de sistemas de defensa, y que la distribución de éstos variaba en función de los serovares analizados [Typhi, Typhimurium y Paratyphi A] (Coluzzi C, et al., 2025). Asimismo, dicho grupo de trabajo mencionó que algunos sistemas de defensa (BREX, PARIS, Mokosh, Retron, Kiwa, AbiU y PD-T4-1) eran exclusivos del *S. Typhimurium*, mientras que otros como Septu eran específicos de los serovares tifoideos. No obstante, en nuestro estudio se detectó la presencia de este primer grupo de sistemas en serovares distintos de

Typhimurium. En particular, el sistema AbiU mostró una fuerte asociación con *S. Derby*, mientras que Retron fue identificado en todos los aislamientos de *S. Montevideo*, *S. Orianenburg* y *S. Panamá*, así como en aislamientos puntuales de *S. Enteritidis* y *S. Paratyphi B*. Por otra parte, en nuestra muestra, el sistema Septu fue hallado únicamente en un aislamiento de *S. Seftenberg*.

Con relación a las dos familias de sistemas de defensa más frecuente en nuestros aislamientos, todos los genomas analizados presentaron sistemas CRISPR/Cas I-E y sistemas R-M de tipo III. Los primeros han sido contemplados como un mecanismo de “respuesta inmune adaptativa” en bacterias por su capacidad para reconocer e interferir con ácidos nucleicos exógenos, y de generar y retener “recuerdos” de infecciones pasadas a través de la incorporación al genoma bacteriano de pequeñas secuencias de ADN exógeno denominadas “espaciadores”; estos espaciadores pueden luego ser empleadas por la maquinaria CRISPR/Cas para interferir específicamente con secuencias de ADN o ARN y prevenir nuevas infecciones (Koonin EV, et al., 2017). Si bien los sistemas CRISPR/Cas se encuentran ampliamente diseminados en enterobacterias, no se ha determinado con exactitud si estos son sistemas activos o si están reprimidos. En tal sentido las secuencias CRISPR de diversas cepas de *Salmonella* y de *E. coli* sugieren que estos sistemas se encuentran reprimidos por proteínas H-NS y que no se tratan de mecanismos inmunes activos (Xue C, et al., 2019); asimismo, asumiendo que los sistemas CRISPR/Cas en *Salmonella* efectivamente juegan un rol activo en defensa frente a ADN exógeno, y en particular contra EGM como plásmidos, el análisis de protoespaciadores en genomas de esta especie muestra que solamente una fracción pequeña correspondería a fagos (10%), y una fracción aún más pequeña (2%) sería de origen plasmídico (Shariat N, et al., 2015). Por su parte, los sistemas R-M de tipo III son heterotrímeros o heterotetrámeros de proteínas codificadas por los genes *res* y *mod*, que participan en la restricción y la modificación, respectivamente; si bien ambas subunidades son necesarias para llevar a cabo el proceso de restricción, para la modificación solo es necesaria la proteína Mod (Oliveira PH, et al., 2014). Por otra parte, se ha visto que

sistemas R-M perteneciente a distintas clases tienden a estar codificados cercanamente en el genoma bacteriano, lo que facilitaría la acción conjunta de los mismos (Oliveira PH, et al., 2014). En este sentido, a excepción de *S. Gallinarum* y *S. Panamá*, que solo portaban el sistema R-M de tipo III, se observó la presencia de dos o más clases de sistemas R-M en la mayoría de los serovares de *Salmonella* analizados en la presente tesis. Así, los serovares Agona, Anatum, Enteritidis, y Hadar presentaron los sistemas R-M de tipo I de tipo III; el serovar Derby portaba sistemas de tipo I, IIG y III, y el serovar Dublín de tipo I, II y III; por su parte los serovares Montevideo y Typhimurium portaban sistemas de tipo I, III y IV. Por otra parte, dos de los serovares menos representados en nuestra muestra (Give y Orianenburg), presentaron los sistemas II y III. Con relación a la transferencia de genes accesorios (p.ej. genes RAM), se ha sugerido que la amplia presencia de los diversos sistemas R-M entre bacterias indica que éstos juegan un papel importante en la defensa contra EGM (Shaw LP et al., 2023). En tal sentido, existen versiones que de alguna manera relativizan el impacto de estos mecanismos de defensa. Por una parte, Dimitriu y cols. mostraron que frecuentemente los plásmidos portan genes con función anti-sistemas R-M y que, en consecuencia, estos sistemas constituirían nada más que una débil barrera frente a la transferencia de material genético mediante conjugación (Dimitriu T, et al., 2024). Por otra parte, recientemente se ha descrito un sistema R-M con un mecanismo particular de acción; específicamente, el sistema DndA-E modifican el ADN agregándole un grupo fósforotioato (PT), en lugar de la metilación, mientras que el módulo de restricción DndFGH reconoce este patrón de modificación y forma un sistema R-M inusual. La evidencia experimental indica que este sistema PT R-M juega un cierto papel inhibitorio en la transferencia horizontal de genes (Xu C, et al. 2023). Este “novel” sistema de defensa fue detectado entre los genomas analizados en esta tesis, específicamente, fue encontrado en todos los aislamientos de *S. panamá* (recuperados en 2002 y 2004) y en un aislamiento de *S. Cerro* recuperado en 2013

Por otra parte, si bien los serovares mayoritarios mostraron perfiles definidos de sistemas de defensa, algunos aislamientos exhibieron patrones divergentes. El análisis de estos

aislamientos *outliers* reveló que la mayoría de estos sistemas de defensa “discordantes” estaban codificados en el cromosoma bacteriano. Esta variabilidad en número y tipo de mecanismos antifágicos podría estar relacionada con la existencia de distintas cepas dentro de cada serovar, con diferencias en los EGM presentes entre aislamientos, y/o con el contenido cromosómico de profagos. En este contexto, se ha identificado una gran variedad de sistemas de defensa en distintos EGM, incluidos fagos temperados, ICEs, islas genómicas adquiridas mediante transferencia horizontal y plásmidos (Rocha EPC, et al., 2022). Asimismo, Coluzzi y cols. han sugerido que las diferencias en el contenido de sistemas de defensas entre serovares podrían estar vinculadas tanto al contenido de profagos específicos de cada serovar como con el tipo de reservorio ambiental. En este sentido, los serovares especialistas (p.ej. tifoideos) estarían expuestos a una menor diversidad de entornos, lo que limitaría su acceso a genes accesorios (Coluzzi C, et al., 2025).

Por otra parte, distintos serovares de SNT fueron categorizados según su contenido de profagos como: i) extremos [de 10.2-11.6/cepa] (*S. Heidelberg*, *S. Inverness*, *S. Newport*); ii) elevado [de 8.2-9.0/cepa] (*S. Infantis*, *S. Stanley*, *S. Typhimurium*); iii) moderado [6.0-7.8/cepa] (*S. Agona*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublín*, entre otros); iv) bajo [5.8/cepa] (*S. Javaiana* y *S. Enteritidis*) (Andrews K, et al., 2024). Esta variabilidad en el contenido de profagos entre y dentro de serovares generalistas (con mayor rango de hospederos) podría explicar la presencia de perfiles de defensa “atípicos” en los distintos serovares de nuestra muestra.

Otra fuente de variabilidad entre nuestros aislamientos estaría ligada a la presencia de sistemas de defensa codificados en plásmidos. Así, se detectó la presencia de numerosos sistemas en plásmidos tanto conjugativos, como movilizables y no movilizables; dentro de los primeros se hallaron sistemas R-M de tipo II (en plásmidos IncN e IncHI2A), MazEF (IncFIA/FIB/FIIB e IncFIB/FII), Mok-Hok-Sok (IncHI1A/HI1B, IncFIB/FII e IncHI2A), Gao-Tmn (IncHI1A/HI1B e IncFIB/FII), SOFIC (IncFIC/FII) y Hna (IncX1 e IncFIB/FII/X1/X3); por su parte, el sistema RnlAB fue encontrado en los dos aislamientos de *S. Panamá* que portaban un plásmido de tipo ColE1 junto a *bla*_{TEM-144}, y los sistemas Shango y PD-T7-2 fueron

detectados en plásmidos no movilizables. La presencia de tantos sistemas de defensa en plásmidos podría servir como una vía para adquirir estos sistemas, y su función en estos EGM serviría para que éstos sean favorecidos por la selección una vez presentes en una nueva célula hospedadora, actuando de manera similar a sistemas de adicción (Oliveira PH, et al., 2014). De manera interesante, varios de los sistemas detectados en los plásmidos de *S. enterica* efectivamente han sido descritos como de adicción: RnlAB, MazEF, Mok-Hok-Sok y Hna; de estos, MazEF es el único que funciona como un sistema TA de clase II (nucleasa), los demás han sido catalogados como mecanismos de infección abortiva (Singh G, et al., 2021; Sather LM, et al., 2023; Lopatina A, et al., 2020). Se ha propuesto que la presencia de mecanismos abortivos en plásmidos, lejos de representar un costo biológico elevado para la célula hospedadora, favorecería su mantenimiento al inducir la cooperación con otros elementos genéticos móviles (Rocha EPC, et al., 2022). En concordancia con la hipótesis anterior, todos los aislamientos de *S. enterica* analizados que presentaban sistemas abortivos codificados en plásmidos se caracterizaron por contener también múltiples grupos de incompatibilidad plasmídica o replicones. Por su parte, los sistemas Gao-Tmn, Shango y PD-T7-2 no han sido tan extensamente estudiados como los anteriores, desconociéndose aún su mecanismo exacto de acción, y qué papel podrían jugar en regular la captación e incorporación (o degradación) de moléculas de ADN exógeno.

8.3. Plasmidoma de *S. enterica*

Con relación al plasmidoma de *S. enterica*, la búsqueda de grupos de incompatibilidad plasmídicos mostró la presencia de estos en 162/212 genomas (76.4%); más aún, en 138/212 genomas (65%) se encontraron replicones pertenecientes a plásmidos conjugativos. Estas cifras llaman la atención, ya que recientemente otros autores, en un análisis de más de 300 genomas de *S. enterica*, hallaron que el 42.1% de dichos genomas presentaban plásmidos conjugativos (Lin H, et al., 2025). Una posible explicación detrás de esta notoria diferencia podría ser que mientras que Li y cols. analizaron únicamente genomas provenientes de

muestras aviares, la colección de genomas analizadas en la presente tesis abarcaba, además de muestras de origen aviar, muestras de origen clínico, alimentario y de origen animal, entre otros. En tal sentido, fue posible evidenciar la existencia de diferencias notorias en la diversidad de replicones plasmídicos en función del serovar, Así, *S. Typhimurium* y *S. Derby* fueron los que se asociaron a una mayor diversidad de grupos de incompatibilidad (p.ej. IncFIB, IncFII, IncI, IncQ, Col, entre otros), *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Heidelberg*, *S. Agona* y *S. Derby* mostraron una variabilidad moderada de grupos de incompatibilidad (entre 4 y 6), mientras que genomas de serovares como *Anatum*, *Give* y *Panamá*, mostraron únicamente un solo replicón plasmídico. Podría conjeturarse la variación en el contenido de plásmidos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad está relacionada con diferencias en el estilo de vida de cada serovar. Es decir, a mayor diversidad en el origen de las muestras, mayor sería la cantidad de replicones detectados. En este sentido, los serovares mayoritarios *Enteritidis* y *Typhimurium*, presentaron un número comparable de orígenes de aislamientos; sin embargo, los genomas de *S. Typhimurium* se asociaron con casi el doble de replicones que los de *S. Enteritidis*. Por su parte, los genomas de *S. Gallinarum* mostraron una diversidad moderada de grupos de incompatibilidad plasmídica a pesar de haber sido obtenidos de cepas aisladas de solo dos orígenes distintos. También podría plantearse la hipótesis de que los aislamientos recuperados a partir de coprocultivos presentan una mayor diversidad de replicones. No obstante, esta relación no se observó en los genomas como *Enteritidis* y *Dublín*. Algunos autores han sugerido la asociación entre serovar y portación plasmídica podría explicarse por diferencias en el contenido de sistemas R-M y de arreglos CRISPR. En tal sentido, se ha visto que genomas de pequeño tamaño carecen de sistemas R-M y se corresponden a su vez con bacterias que presentan pocos eventos (o nada) de THG, mientras que bacterias de genomas pequeños, pero con mayor actividad de THG tienden a mostrar una mayor densidad de sistemas R-M. A su vez, los sistemas R-M podrían alternar entre períodos de selección purificadora y de selección relajada; mientras que la primera llevaría a la pérdida de cambios no sinónimos, la segunda ocurriría durante la coexistencia y competencia de numerosos sistemas R-M (p.ej. plásmidos,

fagos, etc.) y estaría ligada a una rápida pérdida de contenido genético para lograr su permanencia en el genoma bacteriano (Oliveira, PH, et al., 2014). Por su parte, en un trabajo experimental Mamontov y cols. observaron que bajo presión de sistemas CRISPR-cas el contenido plasmídico era menor que su contraparte con sistemas CRISPR-cas no inducidos, sugiriendo la existencia de un fenómeno de interferencia entre este sistema de defensa bacteriano y la presencia de determinados EGM, como plásmidos. Si bien fue posible observar la persistencia de una subpoblación de células bacterianas conteniendo plásmidos, la razón de tal heterogeneidad podría explicarse por la existencia de microambientes en colonias bacterianas y en *biofilms* con estructuras espaciales complejas que determinan interacciones complejas entre los sistemas de defensa celulares y la permanencia de los EGM contra los cuales se montó dicha defensa (Mamontov V, et al., 2022). Por otro lado, cabe aclarar que si bien en nuestra muestra algunos de los serovares portadores de plásmidos (Anatum, Agona, Cerro, Give, Hadar, Heidelberg, Choleraesuis, Montevideo y Panamá) estaban muy poco representados, los estudios de correlación entre el número de sistema de defensa bacterianos y el número de grupos de incompatibilidad plasmídica mostraron una leve correlación positiva. Esto sugiere, por un lado, que los sistemas de defensa no tendrían actividad regulatoria sobre el contenido plasmídico, o, por otro lado, y en línea con lo mencionado en la sección 8.2, que la presencia de algunos mecanismos de defensa favorecería la adquisición y retención de plásmidos (Rocha EPC, et al. 2022).

De acuerdo con lo mencionado en la sección Resultados, los replicones IncFII(pAR0022), IncFII(S) y IncFIB(S) fueron los más frecuentemente detectados en la colección de genomas analizados. Estos corresponderían al plásmido de virulencia de *Salmonella* y su presencia fue detectada en los serovares Agona, Choleraesuis, Dublín, Enteritidis, Gallinarum y Typhimurium. En este contexto, sorprende la presencia de un plásmido de virulencia en uno de los genomas de *S. Agona*, considerando que únicamente unos pocos serovares habían sido previamente identificados como portadores de este plásmido, excluyendo hasta ahora al serovar Agona (Feng Y, et al., 2012). Asimismo, la presencia del plásmido de virulencia en los

genomas de *S. Gallinarum* (pSGAV) y en *S. Typhimurim* (pSTV) mostró cierta variabilidad. En el caso de *S. Typhimurium* pSTV se hereda, además de verticalmente, por transferencia horizontal, ya que se trata de un plásmido conjugativo y por lo tanto horizontalmente transmisible (Robertson J, et al., 2023). Por otro lado, en *S. Gallinarum*, el plásmido pSGAV posee un operón *tra* carente de función, por lo que su transferencia es vertical. No obstante, dicho plásmido podría ser movilizado horizontalmente en presencia de otros plásmidos de tipo F ó F-like que aporten la maquinaria necesaria para la conjugación (Feng Y, et al., 2012; Robertson J, et al. 2023). Una posible explicación por esta variabilidad podría ser la existencia de diferentes linajes asociados a “distintos” ambientes/estilos de vida; en tal sentido, todos los genomas de *S. Gallinarum* provenientes de muestras aisladas de pollo portaban pSGAV, mientras que solo el 11% de los genomas de aislamientos obtenidos de huevos presentaban dicho plásmido.

El segundo grupo de plásmidos en frecuencia, fueron aquellos pertenecientes a los de tipo ColE1. En tal sentido, se detectaron nueve variantes de estos replicones en 55 de los genomas analizados; si bien fueron detectados en múltiples serovares, *S. Derby* y *S. Typhimurium* fueron los que mayor diversidad de replicones de tipo ColE1 mostraron (9 y 4, respectivamente). Los plásmidos de tipo ColE1 son elementos genéticos movilizables pequeños usualmente presentes en varias copias por célula bacteriana, presentes principalmente (pero no exclusivamente) en microorganismos pertenecientes al orden Enterobacterales y a la familia Pasteurellaceae (Ares-Arroyo M, et al., 2018); mayoritariamente, se detectó un solo replicón por plásmido, sin embargo, fue posible evidenciar la presencia de plásmidos pequeños con combinaciones de replicones como Col(pHAD28)/Col440II, ColRNAI/Col440II, Col(MGD2)/Col(Ye4449), ColpVC/Col(BS512); más aún, en un aislamiento de *S. Derby* se encontró una fusión de un plásmido ColRNAI con un plásmido de tipo pKPC-CAV1193, generando así un plásmido híbrido de casi 45 Kb, carente de genes RAM. Se ha reportado que es frecuente encontrar en la naturaleza bacterias portando plásmidos con replicones múltiples, y que existiría una interacción entre éstos y los

sistemas regulatorios bacterianos que ayudaría a sortear la incompatibilidad plasmídica, ampliando así el rango de hospedadores de aquellos plásmidos de rango estrecho (Wang X, et al., 2021; Lin H, et al., 2025).

Por otro lado, los plásmidos de tipo ColE1 han sido reportados como vehículos para genes RAM, confiriendo resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y también a β -lactámicos (Ares-Arroyo M, et al., 2018). En tal sentido, 7 de los distintos genomas que portaban plásmidos de tipo ColE1 portaban genes de resistencia, de manera interesante todos estos plásmidos pertenecían al tipo Col(pHAD28); así, dos plásmidos portaban *bla*_{TEM-144} (correspondiente a dos aislamientos *S. Panamá*, obtenidos de huevos en 2002), dos plásmidos portaban *qnrB19* (un aislamiento de *S. Enteritidis* obtenido de pollo en 2002, y un aislamiento de *S. Typhimurium* recuperado de un coprocultivo en 2008), y tres plásmidos portando los genes *sul2*, *tet(A)*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (tres aislamientos de *S. Typhimurium*, uno aislado de un coprocultivo en 2009, otros 2 de origen alimentario obtenidos en 2008 y 2009). La presencia de *qnrB19* en este tipo de plásmidos es frecuente y ha sido ampliamente reportada (Pallecchi L, et al., 2010; Andres P, et al., 2013). Por otra parte, el alelo *bla*_{TEM-144} es bastante infrecuente, la búsqueda de este en la base de datos nucleotídica de PubMed devolvió únicamente 4 coincidencias; dos de ellas corresponden justamente a los aislamientos de *S. Panamá* mencionados previamente (Vignoli R, et al. 2006), y las restantes 2 corresponden a un aislamiento clínico de *E. coli* de origen chino, y otra cepa de *E. coli* aislada en Arabia Saudita a partir de un recién nacido. Desafortunadamente, no hay publicaciones asociadas a estas últimas como para poder realizar algún tipo de inferencia sobre cómo se dio la aparición de esta variante de *bla*_{TEM} en regiones tan distantes. En otro orden, la detección del tándem de genes RAM *sul2-tet(A)-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id* en plásmidos de tipo ColE1 en *S. enterica* representa, según nuestro conocimiento, un hallazgo novedoso. Si bien este arreglo genético ha sido previamente reportado en plásmidos de *S. enterica*, dichos casos corresponden a plásmidos de tipo IncQ1, en los cuales los genes RAM se encuentran flanqueados por secuencias de inserción de tipo ISCR2 (Jibril AH, et al., 2021;

Vázquez X, et al., 2022). Asimismo, la búsqueda de homología nucleotídicas en la base de datos de PubMed reveló coincidencias con plásmidos similares presentes en aislamientos asiáticos de *S. sonnei*. (100% de cobertura y 99,95% de identidad). En estos plásmidos, al igual que en los detectados en nuestra colección de genomas, el bloque de resistencia no está flanqueado por ningún EGM. Esto sugiere que dicho bloque podría haber sido originalmente capturado desde tipo ColE1 y posteriormente movilizado hacia plásmidos IncQ1 mediante el elemento ISCR2. De todos modos, sería necesario contar con más evidencia para poder confirmar o rechazar tal hipótesis.

El tercer grupo más frecuente de plásmidos en nuestra muestra fue aquellos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncX, estando presente en 32 de los genomas estudiados. Éstos son plásmidos con un rango estrecho de hospedadores, con tamaños que oscilan entre 31-48 Kb, y presentan genes necesarios para su replicación, síntesis del *pilus* y de la maquinaria de apareamiento, y para la función conjugativa, habiéndose detectado hasta la fecha 8 subgrupos (IncX1-IncX8) (Jonhson TJ, et al., 2012; Nohejl T et al., 2022). Así, en nuestra muestra se detectaron únicamente las variantes IncX1 e IncX3, ya sea como replicones únicos o formando *contigs* multireplicones. En tal sentido, en todos los genomas de *S. Dublin* IncX1 se co-localizó junto con los replicones IncFII(S) e IncFII(pAR0022); por otra parte, en aquellos genomas de *S. Typhimurium* en los que se detectaron replicones de tipo IncX, se vio por un lado, fusiones entre plásmidos IncX1 y el pSTV (IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022) y por otra parte, fusiones entre híbridos IncX1-IncX3 y pSTV; del mismo modo, en un único genoma de *S. Enteritidis* se detectó la fusión entre un plásmido IncX1 y su plásmido de virulencia (pSEV). En tal sentido, la formación de cointegrados entre plásmidos IncX y los plásmidos de virulencia de *S. enterica*, no resulta novedosa y ya ha sido reportada previamente (Rozwandowicz M, et al., 2018); más aún, también se ha reportado la formación de cointegrados entre plásmidos IncX y otros de tipo IncH, IncU, e incluso de tipo ColE2 (Bustamante P, et al., 2017). De manera interesante, en uno de los genomas de *S. Typhimurium* se detectó la presencia de un replicón IncX1 en un *contig* cromosómico;

desafortunadamente, no fue posible determinar si esto fue como resultado de errores durante el ensamblado de *reads* de lectura corta, o si efectivamente correspondía a un verdadero fenómeno de integración de este plásmido al cromosoma de la bacteria. Por otra parte, diversos autores han reportado la formación de plásmidos híbridos entre subgrupos distintos de IncX, tales como IncX3-X4 e IncX1-X2, en los cuales se combinan los genes de replicación, partición y estabilidad del primer integrante, y las regiones de mantenimiento y transferencia de ADN del segundo integrante. (Bustamante P, et al., 2017; Gou Q, et al., 2017, Nohejl T, et al., 2022). En este sentido se ha propuesto la formación de plásmidos híbridos a través de eventos de recombinación homóloga mediados por IS26 (Sun J et al., 2016). De manera interesante, entre los genomas estudiados en la esta tesis se identificaron plásmidos híbridos de tipo IncX1-X3, para los cuales no se han encontrado reportes previos. La búsqueda de similitudes en GenBank reveló una estructura similar (61.5% de cobertura y 99% de identidad) en un aislamiento de *S. Gallinarum* proveniente de China. En otro orden, si bien a nivel mundial se ha reportado plásmidos de tipo IncX codificando genes de resistencia transferible a quinolonas (*oqxAB* y alelos *qnr*), genes codificantes de BLEEs (*bla_{CTX-M}*), genes codificantes de carbapenemasas (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*), e incluso genes de resistencia a colistina (*mcr-1*) (Guo Q, et al., 2017), ninguno de los plásmidos IncX detectados en la presente tesis portaba determinantes de resistencia a antibióticos.

Por otra parte, dentro del plasmidoma de nuestra colección de genomas de *S. enterica*, se detectaron además grupos de incompatibilidad “minoritarios” (en términos de su frecuencia), pero relevantes desde el punto de vista de la movilización de genes RAM. Dentro de estos, se hallaron plásmidos de tipo IncQ en seis genomas. Estos son plásmidos movilizables de tamaño relativamente pequeño (5 a 15 Kb) con un amplísimo rango de hospedadores que abarca incluso extremófilos, y por lo tanto presentes en aislamientos clínicos y ambientales. Hasta la fecha se han descrito cuatro subgrupos (IncQ1-Q4) en función del número de genes de movilización y del arreglo de éstos (Loftie-Eaton W, et al., 2012). En tal sentido, en nuestra muestra hallamos plásmidos de tipo IncQ1 (n=5) y de tipo IncQ2 (n=1); como se mencionó

las principales diferencias, a grandes rasgos, entre estos dos subgrupos es que mientras el primero posee tres genes de movilización (*mobABC*), los del segundo subgrupo presentan cinco de tales genes (*mobABCED*), y además portan un sistema TA localizado en el replicón (ausente en IncQ1). Asimismo, la presencia de estos plásmidos en bacterias suele estar asociada a la de plásmidos conjugativos que facilitan su movilización (Loftie-Eaton W, et al., 2012); curiosamente, en uno de los genomas analizados no solo no se detectaron plásmidos conjugativos, sino que el acervo de EGM de tal genoma consistió únicamente de plásmidos movilizables (IncQ y de tipo ColE1). Como se mencionó anteriormente, otro aspecto importante de este tipo de plásmidos es el papel que juegan en la movilización de genes RAM, que confieren resistencia a diversas familias de antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprima, así como también a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenems (Kotsakis SD, et al., 2015; Conte D, et al., 2024); entre los plásmidos IncQ presentes en nuestra muestra, hallamos tres arreglos de genes RAM diferentes, a) un plásmido portando los genes *sul2* y *aph(6)-Id*, b) un plásmido portando los genes *sul2*, *aph(6)-Id* y *tet(A)*, y c) dos plásmidos portando los genes *sul2*, *aph(6)-Id*, y *dfra14*. Por otra parte, uno de los plásmidos IncQ identificados carecía de genes RAM; la ausencia de genes de resistencia en este tipo de plásmidos es infrecuente y generalmente se ve en muestras de origen ambiental o en especies no patógenas (Loftie-Eaton W, et al., 2012). De manera interesante, el genoma que contenía dicho plásmido correspondía a una cepa de *S. Typhimurium* aislada de un coprocultivo. Aún más llamativo, esta cepa portaba los genes de resistencia comúnmente asociados a plásmidos tipo IncQ (*sul2*, *tet(A)*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*), aunque en este caso se encontraban codificados en un plásmido de tipo ColE1. Una posible explicación de este sería un ensamblaje erróneo de los *reads* de lectura corta. En tal sentido, la secuenciación *de novo* de dicho genoma mediante una plataforma de lectura larga, y un ensamblaje híbrido podría ayudarnos a conocer mejor en cuál de los dos plásmidos se encuentra codificado el bloque resistencia.

Otro de los plásmidos “minoritarios” presentes en los genomas de *S. enterica* correspondió al grupo de incompatibilidad IncHI. Este grupo está compuesto por plásmidos de bajo número de copias, con un tamaño que puede oscilar entre 75 y 400 Kb, aproximadamente, y a su vez está subdividido en tres subgrupos IncHI1, IncHI2 e IncHI3 (Rozwandowicz M, et al., 2018). En tal sentido, en el genoma de cinco aislamientos de *S. Gallinarum* detectamos la presencia del replicón IncHI1A/HI1B(R27), todos pertenecientes a su vez al secuenciotipo pST1. Este subgrupo de plásmidos ha sido descrito como vehículo para genes que confieren resistencia a aminoglucósidos, sulfonamidas, fenicoles, macrólidos, aminopenicilinas, tigeciclina, y oximino-cefalosporinas, entre otros (Liang H, et al. 2022; Kubasova T, et al., 2016; Zhang Y, et al., 2023; Lupo A, et al., 2018); no obstante, dichos plásmidos pertenecen a secuenciotipos distintos a los nuestros. En términos de resistencia antibiótica, los cinco plásmidos IncHI1 presentes en nuestros genomas de *S. Gallinarum*, presentaron mayor similitud justamente con el plásmido prototipo R27 (n° acceso NC_002305.1), ya que el único gen RAM codificado en ellos (putativamente) es el gen de resistencia a tetraciclina *tet(B)*, en tal sentido la fragmentación de los *contigs* no permitió armar plásmidos completos para poder verificar tal afirmación. Por otra parte, otros dos genomas mostraron la presencia de plásmidos del subgrupo IncHI2A/HI2; ambos fueron detectados en aislamientos clínicos (coprocultivos) de *S. Typhimurium*, uno recuperado en el año 2008 y el segundo en el año 2016 (plásmido pUY192_H, sección 7.5.3). El análisis de pMLST mostró que el primero pertenecía al secuenciotipo pST2 y el segundo a pST1. Los plásmidos de tipo IncHI2 han sido descritos como de gran tamaño y poseedores de genes que codifican para resistencia a biocidas, metales pesados y más importantemente resistencia a los antimicrobianos (Algarni S, et al., 2024). Dada la fragmentación de los *contigs* del primer genoma, producto de la existencia de múltiples secuencias repetitivas, no fue posible ensamblar el plásmido; no obstante, el plásmido pUY192_H presentó, por una parte, genes relacionados a la resistencia a múltiples metales pesados y a biocidas, y por otra parte mostró la presencia de 19 genes RAM confiriendo resistencia a siete familias de antibióticos, dentro de los cuales se destacaba *bla*_{CTX-M-15}. En tal sentido, la presencia de aislamientos de *S. enterica* productora de CTX-M-

15 en el continente americano ha sido reportada, hasta la fecha, en Honduras, Estados Unidos y Canadá, en pacientes de origen africano o con antecedentes de viaje a África (Liebana E, et al., 2004; Bekal S, et al., 2013; Sjölund-Karlsson M et al., 2011). De manera interesante, la cepa UY192, aislada en 2016, fue recuperada a partir de un paciente pediátrico uruguayo sin antecedentes de viajes al exterior ni contacto con personas que hubieran retornado al país. Además, la ausencia en bases de datos de plásmidos similares o pertenecientes a otros grupos de incompatibilidad, portando islas de resistencias similares a la presente en pUY192_H, dificulta la inferencia sobre el posible origen sobre la adquisición de este EGM en este aislamiento de *S. Typhimurium*. En este contexto, y según nuestro conocimiento, este podría ser el primer reporte de *S. Typhimurium* productora de CTX-M-15 en América del Sur.

Por otra parte, dentro de los genomas analizados se detectó un solo plásmido perteneciente al grupo de incompatibilidad IncN (pUY094_N) presente en un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* recuperado en el año 2012. Estos plásmidos suelen presentar tamaños que oscilan entre 30 y 70 Kb, y han sido descritos como de amplio rango de espectro de hospedadores habiendo sido detectados en muestras de origen humano, ambientales y de origen animal (Dolejska M, et al., 2013). La relevancia de este único ejemplar de plásmido tipo IncN reside en el papel jugado como vehículo para la multidrogo resistencia; en tal sentido pUY094 portaba genes que conferían resistencia a oximiinocefalosporinas (*bla*_{CTX-M-14}), a fluoroquinolonas (*qnrB2*), a tetraciclinas (*tet(A)*) y a inhibidores de la vía del folato (*sul1*, *dfrA25*). Esto está en línea con autores que han reportado a los plásmidos IncN como frecuentemente implicados en la movilización de genes codificantes de BLEE y genes de resistencia a sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas y a aminoglucósidos dentro del orden Enterobacterales (Yu Z, et al., 2024); más aún, también se ha descrito el papel que han jugado estos plásmidos en la movilización de genes codificantes de carbapenemasas en las Américas (Sellera FP, et al., 2021; Gomez-Simmonds A, et al., 2022). Por otra parte, Ikegaya y cols. han abogado a favor de la plasticidad genética de plásmidos IncN pertenecientes al

secuenciotipo pST5 que portan integrones de clase 1 y otros EGM (Ikegaya K, et al., 2023). En tal sentido, en la sección 7.5.1 de la presente tesis se mencionó la similitud entre el bloque de resistencia de codificado en pUY094_N y el del plásmido IncI1 designado pUR-Eco7, identificado en un aislamiento clínico de *E. coli* en 2019; en tal sentido es probable que dicho bloque de resistencia, flanqueado a ambos lados por copias de IS26 haya sido movilizado como unidad transponible desde algún plásmido similar a pUR-Eco7 hacia pUY094_N.

Por otra parte, otro de los replicones frecuentemente asociados a la multidrogo resistencia en aislamientos de *S. enterica*, solos o co-residentes con otros plásmidos portadores de genes RAM, corresponde al de plásmidos de tipo IncC (Chen W, et al., 2016). Éstos son plásmidos de tamaño grande, bajo número de copias, y que presentan un rango de hospedadores muy amplio, habiendo sido detectados en aislamientos de origen humano, veterinario y agrícola, en distintas especies de Enterobacterales así como en Aeromonadales, y distintas especies de Vibrionales (Allain M, et al., 2024). Dentro de nuestra colección de genomas, se detectó la presencia de estos plásmidos en tres aislamientos, más específicamente dos aislamientos de *S. Typhimurium* (UY095 y UY194) recuperados de coprocultivos durante el 2012, y un aislamiento de *S. Enteritidis*, obtenido de un urocultivo en 2022 (UY193). Los dos primeros presentaron un tamaño aproximado de 132 Kb, mientras que el último mostró un tamaño de 168 Kb; esta diferencia en tamaños estuvo relacionada principalmente a la composición de las islas de resistencia ARI-A (ver más abajo). Si bien los tres plásmidos fueron categorizados como IncC de tipo 2, los dos primeros correspondían al secuenciotipo pST3, mientras que el último (pUY193_C) pertenecería a un nuevo pST. Como se mencionó anteriormente, el esquema de pMLST para plásmidos IncC está basado en cuatro alelos (*repA*, *parA*, *parB*, A053). En tal sentido, las variantes alélicas de los loci *parA* y A053 del plásmido pUY193_C, son 2 y 1, respectivamente; por otra los loci *parB* y *repA* muestran 4 y 3 cambios, respectivamente, respecto a las variantes alélicas más cercanas (*parB* = 2, *repA* = 4). Aun asumiendo que el perfil alélico de pUY193_C es *repA* =4, *parA* = 2, *parB* = 2, A053 = 1, no existe en la base de datos PubMLST semejante combinación. Esto último, sumado al

resultado del análisis filogenético (ver sección 7.5.4), sugiere que pUY193_C podría tratarse efectivamente de un nuevo subtipo de plásmidos IncC2 presentes en la región. En otro orden, y como se mencionó anteriormente, los plásmidos IncC han contribuido de manera considerable a la movilización de genes RAM entre diferentes especies bacterianas, destacándose entre estos, genes de los grupos *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M}, y *bla*_{NDM} (Ambrose SJ, et al. 2018; Zhang Y, et al., 2020), y genes codificantes para metilasas ribosomales como *rmtB*, capaces de conferir resistencia a la mayoría de los aminoglucósidos de uso médico (Papa-Ezdra R, et al., 2024). En tal sentido, el plásmido pUY193_C (*S. Enteritidis*, 2022), portaba una isla de resistencia ARI-A constituida por 11 genes RAM, dentro de los cuales destaca *bla*_{NDM-1}. Si bien se han documentado alelos de *bla*_{NDM} en Enterobacterias de origen clínico en Uruguay (Papa-Ezdra R, et al., 2024; Bado I, et al., 2018; Papa-Ezdra R, et al., 2021), hasta ahora no se había registrado ningún aislamiento clínico de *S. enterica* productora de metalo-β-lactamasas en nuestro país. Por otro lado, los plásmidos IncC hallados en *S. Typhimurium* mostraron ser muy parecidos entre sí; así ambos presentaron una isla ARI-B, precedida por dos copias de IS26 en orientación divergente, continuada corriente abajo por una copia de ISCR2, que portaba cinco genes de resistencia (*floR*, *tet(A)*, *aph(6)-Id*; *aph(3'')-Ib*, *sul2*). Esta versión de ARI-B es la más frecuentemente observada en plásmidos IncC, y a su vez está asociada a una delección de unos 11 Kb del esqueleto del plásmido mediada justamente por IS26 (Harmer CJ, et al. 2015b). Otra gran diferencia entre estos plásmidos y pUY193_C, es que los primeros retienen el gen *rhs* pero carecen de genes de resistencia en ARI-A, así como también carecen del operón de resistencia a mercurio. En tal sentido, esto puede haber sido como resultado de distintos eventos de pérdida de elementos genéticos móviles y/o a eventos de delecciones asociadas a distintas secuencias de inserción como IS26 (Harmer CJ, et al., 2015b). Contrariamente a lo reportado por otros autores (Zhang Y, et al., 2020), las islas de resistencia identificadas en los plásmidos IncC de nuestra colección genómica no se hallaban integrados en regiones codificantes de genes esenciales para la funcionalidad plasmídica. Por último, llamó la atención las similitudes entre los aislamientos UY095 y UY194; en tal sentido, además de presentar plásmidos IncC muy similares, ambos

portaban un plásmido de tipo IncI1- α con el gen *bla*_{CTX-M-8}. Ambos aislamientos fueron recuperados en el departamento de Montevideo durante el año 2012, pero en distintos meses. Más allá de las coincidencias los aislamientos UY095 y UY194 presentan distinto acervo plasmídico (distintos plásmidos de tipo ColE1, así como la presencia de un replicón IncX3 en UY095). Sería interesante, conocer si ambos aislamientos poseen algún tipo de nexo epidemiológico o no; de todos modos, es necesario contar con mayor cantidad de metadatos, así como con estudios de SNPs, para poder confirmar o rechazar la existencia de algún tipo de vínculo entre ambos aislamientos.

Por su parte, los plásmidos de tipo IncI1 fueron detectados en 26 aislamientos obtenidos desde fines de la década de 1970 hasta principios de la década del 2010. Una de las posibles explicaciones detrás de la persistencia de estos plásmidos dentro de especies como *S. enterica* estaría dada por el escaso costo biológico para la bacteria hospedadora impuesto por la adquisición de este tipo de plásmidos: En tal sentido Johnson y cols mostraron que la adquisición de plásmidos IncI1 no solo no afectaban el fitness de la bacteria hospedadora, sino que en algunos casos lo mejoraba (Johnson TJ, et al. 2015). Esta ausencia de costo biológico contribuye a que estos plásmidos puedan ser mantenidos establemente en una población bacteriana incluso en ausencia de presión de selección (Wein T, et al., 2020).

Por otra parte, a diferencia de lo reportado por otros autores, los plásmidos IncI1 estuvieron distribuidos a lo largo de diversos serotipos (Kaldhone PR, et al., 2019); en nuestra muestra el mayor número de plásmidos IncI1 fue detectado en genomas de *S. Typhimurium* (n=16), seguido por *S. Derby* (n=5) y luego por *S. Enteritidis* (n=3); otros serovares asociados fueron Cerro y Heidelberg (n=1 c/u). Por otra parte, el principal origen de plásmidos fue aislamientos de origen clínico (fundamentalmente coprocultivos), y en concordancia con lo expresado por otros autores, también fueron hallados en aislamientos de origen aviar, alimentario y ambiental (Foley SL, et al., 2021). En otro orden, el estudio de pangenoma de los plásmidos IncI1 detectados en esta tesis mostró que la mayoría de los genes identificados forman parte del genoma accesorio de estos plásmidos, dentro de los cuales se encuentran principalmente

genes hipotéticos (o que codifican para proteínas de función aun no conocida), pero más importantemente para genes de virulencia, formación de *biofilms*, bacteriocinas, sistemas TA y genes RAM, entre otros. En tal sentido, la búsqueda de genes de virulencia en nuestros plásmidos Incl1 detectó, por un lado, la presencia del gen *ibeB* en un plásmido perteneciente al pST335 y, por otra parte, la presencia de genes similares a *icm/dot* en dos plásmidos pertenecientes a los secuenciotipos pST26 y pST207. El primero de tales genes codificaría para proteínas de membrana externa que contribuyen a la invasión de células endoteliales de la microvasculatura cerebral, a través de interacciones ligando receptor (Huang SH, et al., 1999). A su vez, se ha visto que *icm/dot* mediaría la supervivencia intracelular en células epiteliales en cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* (Eppinger M, et al. 2007). Los plásmidos que portaban *icm/dot*, fueron hallados en aislamientos de *S. Typhimurium* y *S. Derby*, recuperados de pollos y a partir de un coprocultivo, respectivamente; de manera interesante el plásmido que portaba *ibeB* estaba presente en un aislamiento de *S. Typhimurium* obtenido a partir de un hemocultivo. No obstante, no es claro que papel jugarían estos plásmidos Incl1 en la virulencia de *S. enterica*; en tal sentido, la evidencia experimental existente sugiere que dicha contribución no sería significativa (Kaldhone PR, et al., 2017; Kaldhone, et al., 2019).

Por su parte, en 15/26 plásmidos se detectó la presencia de genes codificantes para bacteriocinas y su respectivo gen de inmunidad frente a las mismas; la enorme mayoría correspondió a la colicina *cia* (n=14), y el restante a *cva* (n=1). La primera funciona mediante la formación de canales voltaje-dependientes en la membrana celular de las células diana, mientras que la segunda es una toxina que se exporta a través de la membrana externa de las células diana y llevan a la pérdida del potencial transmembrana y la muerte celular (Cascales E, et al., 2007). De esta manera, estas colicinas plasmídicas ayudarían a la cepa infectante a competir con, o a regular la microbiota de su hospedador (Parker JK, et al., 2022). Del mismo modo, sería necesario contar con mayor número de plásmidos Incl1 de cada pST para poder determinar si existe alguna asociación entre secuenciotipo y la presencia/ausencia de colicinas. En otro orden, todos los plásmidos Incl1 presentaron dentro de los genes

accesorios el sistema TA *pndAC*; no obstante, algunos de estos plásmidos portaban entre dos a cuatro sistemas TA, no pareciendo existir algún tipo de nexo entre secuenciotipo plasmídico y sistemas TA específicos. Todos los sistemas detectados pertenecen al tipo II, en el cual tanto la toxina como la antitoxina son de naturaleza proteica, y la neutralización de la toxicidad está dada por la formación de complejos proteína-proteína entre ambos componentes (Qiu J, et al., 2022). Asimismo, esta redundancia de sistemas TA en plásmidos aumentaría las probabilidades de fijarlos dentro de una población bacteriana, sobre todo en casos de coexistencia de plásmidos compatibles dentro de una misma célula bacteriana, así luego de numerosas instancias de conjugación y de exclusión, aquel plásmido que contenga uno o más sistemas TA puede “sobrevivir” a un segundo plásmido carente de sistemas TA, o con menor número de estos (Unterholzner SJ, et al., 2013).

Globalmente los plásmidos de tipo IncI1 han sido objeto de estudio por su habilidad para portar genes RAM (Foley SL, et al., 2021). Así, en nuestra muestra 16/26 plásmidos portaban algún determinante de resistencia. Con relación a la resistencia a β -lactámicos, se detectaron 18 genes codificantes de β -lactamasas distribuidos en 14 plásmidos. Esto refuerza lo expresado por otros autores que destacan el papel jugado por plásmidos de tipo IncI1 en la diseminación de β -lactamasas (Carattoli A, et al. 2021). De manera interesante, Smith y cols. analizaron una colección de más de 250 plásmidos de distintos países pertenecientes a este grupo de incompatibilidad que portaban genes codificantes de BLEES o enzimas de tipo AmpC, en la cual pudieron observar la asociación entre diferentes β -lactamasas, secuenciotipo plasmídico, y origen de la muestra (Smith H, et al., 2015). Con relación a dicho trabajo es posible trazar algunas semejanzas y múltiples diferencias. Así, en los plásmidos IncI1 de *S. enterica* en Uruguay el gen más frecuentemente detectado fue *bla*_{TEM-1} (n=6); otra de las diferencias correspondió a la distribución de BLEEs, siendo *bla*_{CTX-M-8} y *bla*_{SHV-2} (n=2 c/u) y *bla*_{CTX-M-14} (n=1) las halladas en nuestra colección de plásmidos IncI1. Curiosamente, mientras que Smith y cols. no mencionan la presencia de genes codificantes de oxacilinasas en su trabajo, tres de nuestros plásmidos portaban el gen *bla*_{OXA-9}. Por otro lado, y de manera

similar a lo hallado por los anteriores investigadores, las enzimas de tipo AmpC estaban codificadas por el gen *bla*_{CMY-2}, (n=4), todos presentes en plásmidos pertenecientes al secuenciotipo pST12. De este modo, mientras que las diferencias entre los alelos de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} y *bla*_{OXA}, y de secuenciotipos de plásmidos IncI1 presentes en *S. enterica* en esta tesis podría corresponder a diferentes patrones de circulación regional de genes RAM y de distintos EGM (Yu K, et al., 2024), la presencia de *bla*_{CMY-2} en plásmidos IncI1 pST12, ha sido reportada mundialmente, tanto en bacterias patógenas y comensales tanto de humanos como de origen animal; en virtud de lo anterior, y dada la capacidad de adquirir genes RAM de importancia clínica, es que recientemente se ha designado a IncI1 pST12 como plásmidos epidémicos (Carattoli A, et al., 2021). En nuestra colección el primer plásmido perteneciente a este secuenciotipo se encontró en un aislamiento de *S. Heidelberg* de origen aviar, y a su vez dicho plásmido no portaba genes de resistencia; la presencia de genes RAM en plásmidos IncI1 pST12 en aislamientos uruguayos de *Salmonella* no se vio sino a partir del año 2009, correspondiendo al gen *bla*_{CMY-2}; luego, a partir del 2012, aparecieron plásmidos portando el gen *bla*_{SHV-2}. De manera interesante, el primer registro de plásmidos IncI1 pST12 en la base de datos de PubMLST (https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_plasmid_isolates), corresponde a plásmidos también presentes en aislamientos de *S. Heidelberg* recuperados en los Estados Unidos en el año 2001, aunque a diferencia de nuestro primer registro, estos ya portaban alelos *bla*_{CMY-2} (Folster JP, et al., 2010).

Con relación a mecanismos transferibles de resistencia a otras familias de antibióticos, se detectó relativamente poca variedad de genes. En tal sentido se hallaron genes que conferían resistencia a aminoglucósidos [*ant(3'')*-Ia, *aac(6')*-Ib, *aac(3)*-VIa], sulfonamidas (*sul1*), y macrólidos (*ermB*). La presencia del gen *ermB* en plásmidos IncI1 no es un hecho reciente en nuestro país. El primer reporte data de 2019, a partir de un aislamiento clínico de *E. coli* (Di Pilato V, et al., 2019) y posteriormente dicha plataforma fue identificada en un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* (Cordeiro NF, et al., 2020). Sin embargo, en el marco de esta tesis se detectó que *ermB* en plásmidos IncI1, ya se encontraba en Uruguay al menos desde 2011,

en un aislamiento de *S. Enteritidis*. Los tres plásmidos pertenecieron al pST80; la principal diferencia entre ellos fue la ausencia del gen *bla*_{CTX-M-14}, en aquel plásmido detectado en *S. Typhimurium* en el año 2020. Este hallazgo sugiere, por un lado, que esta plataforma genética estaba presente en nuestro país antes del primer aislamiento documentado, y por otra parte, que a lo largo del tiempo dicho plásmido experimentó múltiples rearrreglos a lo largo del tiempo, resultando en la pérdida del gen de la β -lactamasa (ver sección 7.5.1). En otro orden, la presencia del gen *sul1* en plásmidos de tipo Inc11 ha sido reportada mayoritariamente en aislamientos de origen animal y asociados al pST3 (Dolejska M, et al., 2018; Valcek A, et al., 2019); curiosamente, el alelo detectado en nuestros plásmidos también era de origen animal (pollo), pero perteneciente al pST26. Una explicación probable de tal diferencia, tomando en cuenta la diversidad de secuenciotipos detectados entre nuestros plásmidos Inc11, y sumado a la ausencia de representantes del pST3, sería justamente la circulación de linajes plasmídicos local y/o regionales. La existencia de reportes que describen la presencia en Brasil de pST similares a los nuestros, apoyaría la anterior hipótesis (Ferreira JC, et al., 2014). Por último, un hecho llamativo fue la detección del tándem de resistencia *bla*_{TEM-1}/*bla*_{OXA-9}/*ant(3'')*-*la/aac(6')*-*lb* en tres plásmidos pertenecientes a diferentes pST, todos presentes en aislamientos de *S. Derby* y recuperados a partir de coprocultivos durante el mismo año. La presencia de dicho bloque de resistencia en plásmidos pertenecientes a diferentes pST y con diferentes tamaños descartaría una posible repetición de muestras, o un posible brote. De todos modos, carecemos de la información epidemiológica necesaria, y de archivos fastq para poder realizar estudios de SNPs, ausencia/presencia de *indels* u otros rearrreglos genéticos, que nos permita establecer con mayor certeza la existencia o no de algún vínculo entre tales aislamientos.

8.4. Resistoma de *S. enterica*

Dentro de la colección de genomas analizados, en 68 se detectó la presencia de genes RAM. La mayoría de dichos genes codificaban para enzimas modificadoras de aminoglucósidos,

seguido por genes codificantes de β -lactamasas, genes de resistencia a fosfomicina y genes de resistencia a tetraciclina, entre otros. Por otro lado, cabe aclarar que genes codificantes para bombas de eflujo intrínsecas, y genes codificantes para reguladores globales no fueron tenidos en cuenta durante la presente tesis debido a que frecuentemente presentan una amplia variedad de sustrato, siendo difícil determinar cuál de ellos está asociado a un fenotipo de resistencia determinado (Emond-Rheault JG, et al., 2020).

Informes recientes de la National Antimicrobial Resistance Monitoring Systems (NARMS) de los Estados Unidos y del European Centre for Disease Prevention Control (ECDC) han informado acerca de las tendencias en resistencia a antibióticos de importancia crítica en *Salmonella enterica*, tanto en América de Norte como en la Comunidad Europea. Resumidamente, el informe de la NARMS indicaba que, si bien la vasta mayoría de los aislamientos humanos de *Salmonella* eran susceptibles a todos los antibióticos ensayados, todavía persistían elementos de resistencia considerados como una amenaza para la salud humana y animal. En tal sentido, si bien la resistencia a ceftriaxona en humanos era de bajo nivel aún se observaba una tendencia creciente; por su parte, en los aislamientos de origen animal, la resistencia a dicho antibiótico había descendido o permanecido estable. Con relación las fluoroquinolonas, el informe de la NARMS indicó que los niveles de susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina seguían en aumento tanto en aislamientos de origen humano como animal. Asimismo, esta organización detectó bajos niveles de resistencia a azitromicina en aislamientos humanos, y de modo preocupante también en muestras animales y de alimentos, no detectando sin embargo cepas resistentes a carbapenems independientemente del origen de la muestra (<https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/2018-narms-update-integrated-report-summary-interactive-version>). Por otra parte, los datos presentados por la ECDC fueron más heterogéneos entre los distintos países de ese bloque económico; de todos modos, la tendencia general mostró que en casos humanos los niveles de resistencia a ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas fueron elevados, mientras que los niveles generales

de resistencia a cefalosporinas de tercera generación fueron muy bajos. Por su parte, en aislamientos de origen animal los niveles de resistencia a ampicilina, tetraciclina y sulfonamidas fueron de moderados a muy altos, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación rara vez fue detectada. Los niveles de resistencia a fluoroquinolonas en Europa tanto para aislamientos de origen humano como animal oscilaron entre altos y muy altos; por el contrario, la resistencia a colistina en aislamientos de *Salmonella* en Europa fue infrecuente (European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control, 2022).

En Uruguay, la comparación de los niveles de resistencia en *S. enterica* entre los periodos 1976-1988 y 1989-2000, mostró que hubo una caída en la resistencia a antibióticos. De este modo al iniciar el siglo 21, si bien la resistencia estreptomocina permanecía elevada, la resistencia a otros antibióticos como gentamicina, kanamicina cloranfenicol y ácido nalidíxico permanecían muy bajos, no detectándose cepas resistentes a fluoroquinolonas, a cefalosporinas de tercera generación ni a amikacina (Macedo M, et al., 2009). Por otra parte, al comparar los niveles de resistencia observados en el periodo 2001-2022 con el periodo anterior se observó que se mantuvo la tendencia descendente en la resistencia a la estreptomocina, tetraciclinas y sulfonamidas/inhibidores del folato, alcanzando valores de 10%, 13.07% y 3.8%, respectivamente. Por otra parte, para los demás antibióticos ensayados la tendencia fue al aumento en los niveles de resistencia, en especial para aquellos de importancia crítica para la salud humana. Así, el nivel de resistencia a aminopenicilinas y cefalosporinas de primera generación alcanzó 13.07%, mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación fue de 10.7% para ceftriaxona y de 5,4% para ceftazidima. Por su parte, la susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas llegó a 7.7%. Estos valores de resistencia a β -lactámicos son muy similares a datos reportados recientemente en aislamientos clínicos de *S. enterica* en Sao Paulo, Brasil, sin embargo, nuestros valores de sensibilidad disminuida a fluoroquinolonas son sensiblemente superiores (Calarga AP, et al., 2022). Por otro lado, el nivel de resistencia a fluoroquinolonas detectado

en esta tesis fue inferior a valores reportados previamente por nuestro grupo para aislamientos recuperados entre 2011 y 2013 (Cordeiro NF, et al., 2016); esta discrepancia podría deberse a una diferencia en el criterio de inclusión de las muestras analizadas. En contraste con el trabajo anterior, que incluyó aislamientos clínicos con resistencia a fluoroquinolonas y/o oximino-cefalosporinas, los genomas analizados en esta tesis fueron seleccionados para abarcar también cepas de origen animal, alimentario y ambiental, independientemente de su perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se podría emplear un argumento similar con relación al trabajo de Macedo y cols., cuya muestra abarcaba únicamente aislamientos de *S. Typhimurium* de origen humano (Macedo M, et al., 2008).

Con relación a los genes transferibles de resistencia a fluoroquinolonas, entre los genomas analizados se detectaron los alelos *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB2*, *qnrB19*, *aac(6')-Ib-cr*, y *oqxAB*. Así, *qnrA1* fue detectado formando parte de la tercera región variable en un novel integrón complejo de clase 1, codificado en un plásmido de tipo IncC2 (pUY193_C). Por su parte, *aac(6')-Ib-cr* y *qnrB1* se encontraban formando parte de una isla de resistencia de gran tamaño, codificada en un plásmido de tipo IncHI2A/HI2 (pUY192_H); el primero, como gen *cassette* en un integrón de clase 1 y el segundo, flanqueado corriente arriba y corriente abajo por copias de IS26 e IS3000, respectivamente. A su vez, *qnrB2* se halló dentro de la segunda región variable de un integrón complejo de clase 1, portado por un plásmido de tipo IncN (pUY094_N); a diferencia de los genes anteriormente mencionado, codificados en sendos y noveles plásmidos conjugativos, *qnrB19* fue detectado en dos pequeños plásmidos de tipo Col(pHAD28), ubicuos y similares a otros previamente reportados. De manera interesante, se ha visto recientemente la capacidad de estos últimos plásmidos de poder ser movilizados también mediante un mecanismo de transducción fágica; esto podría contribuir aún más con la diseminación de *qnrB19* y de otros genes (Moreno-Switt AI, et al., 2019). En otro orden, no fue posible dilucidar el entorno genético de *oqxAB*, detectado en uno de los genomas estudiados, dada la fragmentación de los *contigs*. Se ha especulado que estos genes han sido movilizados a partir del cromosoma de *K. pneumoniae* gracias a la inserción de dos

copias de IS26 a ambos lados de dicho locus, dando lugar a la formación de la unidad transponible Tn6010 (Norman A, et al., 2008). Del mismo modo, si bien OqxAB ha sido catalogado como un mecanismo transferible de resistencia a quinolonas, ésta depende de la sobreexpresión del mismo (Chan BK, et al., 2022). En tal sentido no llevamos a cabo estudios de expresión de OqxAB para evaluar su posible contribución al fenotipo de resistencia a las fluoroquinolonas.

Con relación a los genes codificantes de β -lactamasas, fue posible observar una variación temporal en relación con las variantes detectadas, coincidente con lo reportado por otros autores (Foley SL, et al., 2021). Así, en los genomas de cepas aisladas durante las décadas de 1970 y 1980, los genes detectados correspondieron a *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-4} y *bla*_{OXA-9}, todos ellos responsables de codificar para enzimas con perfil hidrolítico estrecho. Una excepción a esto fue el gen *bla*_{OXA-1}; si bien los primeros reportes corresponden a finales de la década del 60, y se trata de una variante ampliamente distribuida a nivel mundial (Meng L, et al., 2023), el único alelo detectado entre los genomas analizados corresponde a un aislamiento recuperado en el año 2016. Por otra parte, desde comienzos de la década del 2000, aunque aún se detectaban cepas portadoras de *bla*_{TEM-1} con menor frecuencia, empezaron a registrarse los primeros aislamientos de *S. enterica* productores de BLEE y de cefalosporinas. Así, los primeros genes codificantes para BLEE correspondieron a *bla*_{TEM-144}, detectados en 2002 en *S. Derby*; este gen deriva de *bla*_{TEM-1}, y la enzima codificada presenta dos cambios aminoacídicos en el bucle omega, otorgándole actividad hidrolítica sobre ceftazidima (Vignoli R, et al., 2006). Por su parte, a partir del año 2009 se registran los primeros aislamientos en Uruguay y también a nivel de Sudamérica de *S. Typhimurium* portando el gen *bla*_{CMY-2} codificado en plásmidos de tipo Inc11/pST12 (Cordeiro NF, et al., 2013). Posteriormente, aparecieron los primeros aislamientos de *S. enterica* productoras de BLEEs congénitas de la familia CTX-M; el primero, cronológicamente hablando, fue un aislamiento de *S. Enteritidis* que portaba el gen *bla*_{CTX-M-14} en un plásmido de tipo Inc11 (año 2011) (Bado I, et al., 2012); de manera interesante, un año más tarde se detectó un

aislamiento de *S. Typhimurium* portando el mismo gen, pero en un plásmido de tipo IncN (Cordeiro NF, et al., 2020). La segunda variante de CTX-M fue detectada también a partir del año 2012, tratándose de aislamientos de *S. Typhimurium* que portaban el gen *bla*_{CTX-M-8} en plásmidos de tipo IncI1. Otra particularidad detectada en esta línea cronológica fue la detección, también a partir del año 2012, del gen *bla*_{SHV-2} también codificado en plásmidos de tipo IncI1/pST12. Este gen fue reportado por primera vez a mediados de la década del 80 (Kliebe C, et al., 1985), y como fuera mencionado anteriormente, deriva de *bla*_{SHV-1}, y se diferencia de ésta, merced a una mutación que codifica para un cambio aminoacídico; dicho cambio amplía el perfil hidrolítico de la β-lactamasa de cefalosporinas de primera generación a cefalosporinas de tercera generación (Garvarg-Chenon A, et al, 1990). Por otro lado, a mediados de la década del 2010 se vio un cambio en la epidemiología de las BLEE en las Enterobacterias circulantes en nuestro país, pasando a ser *bla*_{CTX-M-15} la predominante (Bado I, et al., 2016; García-Fulgueiras V, et al., 2017). En tal sentido, dicho gen también fue encontrado en un aislamiento de *S. Typhimurium* obtenido en el año 2015; de forma similar a lo descrito por García-Fulgueiras y cols., *bla*_{CTX-M-15} también estaba codificado en un plásmido de tipo IncHI2A/HI2, e iba acompañado, entre otros genes RAM, por *aac(6')-Ib-cr* y *qnrB1*. Por último, durante el año 2022, se detectó una cepa de *S. Enteritidis* productora de NDM-1, aislada del urocultivo de un paciente con internación prolongada por COVID-19; en tal sentido, *bla*_{NDM-1} estaba codificado en integrón complejo de clase 1, junto a otros genes RAM que conferían resistencia a antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, inhibidores del folato y cloranfenicol. Este integrón estaba a su vez inserto en el plásmido IncC2 designado como pUY193_C. De manera interesante, este plásmido habría sido transferido, durante el periodo de internación, desde una cepa *E. cloacae* colonizante del tracto digestivo del paciente; a una cepa de *S. Enteritidis* que éste contrajo durante su hospitalización. En tal sentido, el tratamiento con ciprofloxacina recibido por este paciente actuó como seleccionador y coseleccionador de múltiples genes RAM (Cordeiro N, et al., 2025). Por otro lado, si bien existen reportes previos de *S. enterica* productora de NDM (Wang J, et al., 2022; Huang Y, et

al., 2022), esta sería la primera detección de *S. Enteritidis* portando el gen *bla*_{NDM-1}, tanto en Uruguay como en Sudamérica.

Otro antibiótico de importancia crítica para el tratamiento de las salmonelosis es la azitromicina (WHO, 2019), considerado como una de las pocas alternativas para el tratamiento de infecciones gastrointestinales severas por microorganismos resistentes a antibióticos como fluoroquinolonas y/o oximino-cefalosporinas (Ivanova M et, al., 2024). Por tal motivo resulta sumamente preocupante la detección de genes codificantes para resistencia a macrólidos en tres de los genomas analizados, específicamente los genes *ermB* (n=2) y *mph(A)* (n=1). A su vez, estos genomas presentaban, entre otros, genes de resistencia a más antibióticos de importancia crítica; así, las combinaciones fueron: i) *bla*_{CTX-M-14}/*ermB*, ii) *bla*_{CTX-M-14}/*ermB*/*qnrB2* y iii) *bla*_{NDM-1}/*mph(A)*/*qnrA1*. En Uruguay, la prevalencia de resistencia a azitromicina entre los aislamientos de *S. enterica* es baja (1.4%), sobre todo si se compara contra datos de países como China, Taiwan o el Reino Unido, donde dicha prevalencia, en aislamientos de SNT, alcanzaba valores de 3.1% para los dos primeros y 2.2% para el último, respectivamente (Wang H, et al., 2023). De todos modos, la detección de aislamientos en los años 2011, 2012, y más recientemente en 2022, portadores de genes de resistencia a las tres familias de antibióticos de primera línea para el tratamiento de las salmonelosis, codificados en plásmidos conjugativos, debería constituir un motivo de seria preocupación para las autoridades sanitarias.

Con relación a otras familias de antibióticos, resulta llamativo el cambio en la tendencia de resistencia al cloranfenicol. En tal sentido, al analizar aquellos aislamientos de SNT recuperados desde el 2001 a la fecha, se constató un incremento en el nivel de resistencia a dicho fármaco, siendo *catA1* y *floR* los determinantes de resistencia más frecuentemente detectados (n=5, n=2, respectivamente). Como se mencionó en la sección resultados, dichos genes estaban codificados en islas de resistencia en plásmidos conjugativos como pUY192_H, pUY193_C y pUY194_C. Por otro lado, en nuestro país el uso veterinario del cloranfenicol o de productos veterinarios en base a dicho fármaco está prohibido desde el

año 1986 (Resolución S/N/986, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca); en tal sentido, la ausencia de mecanismos regulatorios previos sobre el uso agropecuario del cloranfenicol podría explicar los niveles de resistencia presentes en el periodo 1976-1988. Asimismo, dada su toxicidad e interacción con otros medicamentos, su uso sistémico en medicina humana a nivel mundial está limitado a infecciones graves en las que los beneficios superan los posibles efectos adversos, tal como fiebre tifoidea o rickettsiosis, entre otras. Más aún, en Uruguay el cloranfenicol no aparece recomendado en las distintas guías de tratamiento (<https://www.proa.hc.edu.uy/>); sin embargo, recientemente se ha optado por el uso tópico de este antibiótico como alternativa terapéutica para las infecciones oculares (Lorenzo D, 2019). De este modo y en concordancia con otros autores (Puangseree J, et al., 2024), dado el entorno genético de *catA1*, *floR*, y *cmIA1*, la coselección con otras familias de antibióticos podría ser una posible explicación detrás de la de persistencia de estos genes en los genomas de SNT analizados en esta tesis. Con relación a la resistencia a tetraciclina, se constató una fuerte caída en los niveles de resistencia entre el periodo 1987-1988; esta disminución puede haber sido a consecuencia del uso clínico de antibióticos más nuevos y considerados como más eficaces y seguros (p.ej. cefalosporinas o quinolonas) (Ayliffe GA et al., 1979), mientras que a nivel agropecuario, al menos en Europa, se prohibió el uso de este antibiótico como profiláctico y/o como factor de crecimiento (van Leeuwen WJ, et al., 1979). Por otro lado, si bien la resistencia a tetraciclina en aislamientos de SNT continuó mostrando una tendencia descendente, la diferencia de los niveles de resistencia entre aquellos aislamientos recuperados en los periodos 1989-2000 y 2001-2022, fue de tan solo 0.53%. En tal sentido, la resistencia transferible a este antibiótico estuvo mediada por los genes *tet(A)*, *tet(B)* y *tet(C)*; en concordancia con lo reportado por otros autores, los dos primeros alelos fueron los más frecuentemente detectados (Grossman TH, 2016; Pong CH, et al., 2020). De manera interesante, de manera similar a lo reportado con los genes codificantes para β -lactamasas, los distintos alelos *tet* parecen haber seguido una tendencia temporal variable; así mientras que *tet(C)* fue hallada en genomas correspondientes a aislamientos de finales de los 70 y principios de los 80, el gen *tet(B)* fue detectado en genomas de aislamientos obtenidos a

principios de la década del 2000; por otro lado, si bien *tet(A)* fue hallado en el genoma de un aislamiento de fines de los 90, su mayor incidencia se vio desde mitad de la década del 2000 hasta el presente. Desconocemos si esta variación temporal obedeció a patrones de circulación local o simplemente es producto del azar. Asimismo, las tetraciclinas son antibióticos ampliamente empleados en la industria agropecuaria (Quiñones B, et al., 2024), estando su uso también avalado en nuestro país (<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/legislacion-sanitaria-animal/legislacion-sanitaria-animal/28-productos>). Así, esta relativa estabilidad en los valores temporales de resistencia a tetraciclinas en SNT, podría obedecer tanto a causas de presión de selección como a fenómenos de coselección por otros antibióticos.

Como se mencionó anteriormente, en conjunto los genes de resistencia a aminoglucósidos fueron los más frecuentemente detectados, y dentro de estos *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* (también conocidos como *strA* y *strB*) y *ant(3'')-Ia* fueron los principales. Estos tres confieren resistencia a estreptomicina, que además de su uso en medicina humana, es uno de los más empleados en la industria avícola (Bhandari M, et al., 2023); asimismo es frecuentemente empleado tanto como suplemento alimenticio para cerdos, así como también a modo de pesticida en agricultura (Emond-Rheault JG, et al., 2020). A pesar de ello, la mayoría de los genomas en donde fueron hallados correspondieron a aislamientos de origen humano. Por otra parte, luego del descenso en los niveles de resistencia observados entre los periodos comprendidos entre 1976-1988 y entre 1989-2000, se volvió a registrar un discreto aumento en los niveles de resistencia a tobramicina, kanamicina gentamicina y amikacina, codificado por genes como *ant(2'')-Ia* y *aac(6')-Ia*, entre otros. En otro orden, la resistencia a la combinación trimetoprima-sulfametoxazol estuvo dada por *sul1* y combinaciones de *dfrA14*, *dfrA25* o *dfrA27*, presentes en integrones de clase 1; por otra parte, si bien se detectó la coexistencia de *sul1* y *dfrA1* en distintos genomas, este último se halló siempre codificado en integrones de clase 2. Otra combinación de genes confiriendo resistencia a dichos inhibidores de la vía del folato fue la de *sul2/dfrA14* en dos genomas diferentes; esta combinación resultó

interesante, ya que en ambos genomas el gen *dfrA14* se encontraba interrumpiendo al gen de resistencia a aminoglucósidos *aph(3'')-Ib*. Por su parte, la resistencia a sulfafurazol estuvo codificada, en un caso por *sul1*, que formaba parte de un integrón de clase 1, cuyo único gen RAM cassette era *ant(3'')-IIa*; y por otro lado, la resistencia a dicho antimicrobiano también estuvo codificada por el gen *sul2*, ya sea como parte de la isla ARI-B (solo o junto a otros genes RAM) en plásmidos de tipo IncC2, o integrando el bloque de resistencia *sul2/aph(3'')-Ib/aph(6)-Id*. Este tándem de genes RAM fue descrito por primera vez en Australia en plásmidos IncQ presente en aislamientos humanos y bovinos de *S. Typhimurium* (Yau S, et al., 2010). En línea con lo expresado por los anteriores autores, en nuestra colección de aislamientos dichos genes no solo fueron hallados en plásmidos IncQ, sino también en plásmidos pertenecientes a diversos grupos de incompatibilidad, como IncC2, IncHI2A/HI2 y de tipo Col(pHAD28).

Finalmente, la Organización Mundial de la Salud, en su edición del año 2024 mantiene dentro del grupo crítico a los Enterobacteriales resistentes a cefalosporinas de tercera generación y resistentes a carbapenems, y dentro de los del grupo de alta prioridad a SNT resistente a fluoroquinolonas (WHO, 2024). Asimismo, dicho organismo mantiene dentro de la lista de antimicrobianos de importancia crítica a las cefalosporinas (3^a, 4^a y 5^a generación), carbapenems, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y polimixinas, entre otros (WHO, 2019). En tal sentido, resulta alarmante la detección de aislamientos de *S. enterica* productoras de 16s ARNr metiltransferasas plasmídicas, que confiere resistencia de alto nivel a prácticamente todos los aminoglucósidos de importancia médica (Folster JP, et al., 2009; Lu X, et al., 2021). Por otra parte, no menos preocupante resulta también la circulación a nivel mundial de *S. enterica* productora de MCR, un mecanismo transferible de resistencia a colistina (Zhang Z, et al., 2022), existiendo incluso reportes de su presencia en Brasil (Rau RB, et al., 2020). En la presente tesis no se detectó la presencia de genes codificantes para 16s ARNr metiltransferasa o de alelos *mcr* entre los genomas de SNT estudiados. No obstante, en trabajos previos llevados a cabo entre los años 2016-2019, por el Laboratorio de

Resistencia Antibiótica de la Unidad Académica de Bacteriología y Virología, se detectó la presencia, entre otros genes RAM, de *mcr-1* en Enterobacterales obtenidos de muestras de avícolas y ganado porcino en Uruguay, así como también Enterobacterias portando *mcr-9* y *rmtG* en materia fecal de pollitos de un día de vida, importados desde Brasil (Coppola N, et al., 2020; Coppola N, et al., 2022). En virtud de tales hallazgos, y teniendo en cuenta que aproximadamente un 75% de las salmonelosis humanas están asociadas al consumo de pollos, huevos, carne de cerdo, carne vacuna, verduras y frutas contaminadas, entre otros (Han J, et al., 2024), es necesario implementar y afirmar estrategias en el contexto de “Una Salud” para evitar la posible aparición de aislamientos de *S. enterica* para los cuales no queden recursos terapéuticos para su tratamiento.

8.5. Conclusiones

Hemos abordado la temática de la resistencia en *S. enterica* en Uruguay desde la genómica, intentando conocer aspectos como variación a lo largo del tiempo de esta, y las plataformas genéticas que han estado asociadas a los distintos determinantes de resistencia.

Con relación a nuestra hipótesis de trabajo, no se observó una acumulación progresiva de genes RAM en aislamientos uruguayos de *S. enterica* a lo largo del periodo estudiado. No obstante, se pudo constatar la existencia de dos picos de acumulación de tales genes, ubicados a finales de la década de 1970 y a partir de la década de 2010; además, se pudo ver un recambio de los genes RAM entre ambos picos, asociados a la vez a distintos EGM.

Globalmente, fue posible observar la existencia de una diversidad de plásmidos y de genes RAM circulando a lo largo del tiempo entre los aislamientos de *S. enterica* en Uruguay. En este sentido, los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad Inc11- α fueron los más frecuentemente asociados a genes RAM; asimismo, se vio la circulación en nuestro país de plásmidos epidémicos (Inc11/pST12), y la presencia de clones no descritos previamente.

Resultó interesante ver que algunos genes RAM (*bla*_{OXA-9} y *qnrB19*) ya se encontraban presentes en nuestro país, incluso antes de haber sido reportados por primera vez a nivel mundial; por otra parte, también se detectó por primera vez la presencia del gen *bla*_{CTX-M-15} en *S. Typhimurium* a nivel de Sudamérica.

Por otra parte, se cotejó la existencia en *Salmonella* de un recambio en los genes codificantes para β -lactamasas, que estuvo acompañado a los cambios en la epidemiología de estas enzimas en nuestro país.

Finalmente, fuimos testigos directos, en el caso del aislamiento de *S. Enteritidis* productor de NDM, de cómo el uso de algunos antimicrobianos puede colaborar en el mantenimiento de genes de resistencia a “viejos” antibióticos que tienen poco o muy poco uso en la práctica médica en Uruguay.

9. PERSPECTIVAS

Con el advenimiento de nuevas plataformas de secuenciación capaces de analizar un mayor número de genomas a un coste menor, sería interesante estudiar más aislamientos de origen clínico y ambiental de *S. enterica* obtenidos desde el 2020 en adelante; esto nos permitiría ver que tipo de efecto tuvo la pandemia COVID-19, si alguno, sobre los patrones de resistencia antimicrobiana de este microorganismo.

En la presente tesis, no fue posible realizar el ensamblado completo de varios plásmidos portadores de genes de resistencia y/o de numerosos grupos de incompatibilidad debido a la fragmentación de *contigs* por presencia de secuencias repetitivas. En tal sentido, cabría realizar la re-secuenciación mediante plataformas de lectura larga (p.ej. Nanopore) para poder llevar a cabo un ensamblaje híbrido de dichos genomas lo que permitiría dilucidar con mayor detalle los entornos genéticos de genes RAM y de los EGM que los portan.

Asimismo, si bien ha sido posible ensamblar plásmidos completos mediante plataformas de lectura corta (sobre todo aquellos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncI1), la estrategia de ensamblado híbrido podría permitirnos detectar con mayor facilidad plásmidos de gran tamaño no tipificables mediante el esquema PBRT, o que aún no han sido ingresados en las correspondientes bases de datos. Por otra parte, este abordaje podría facilitar el estudio de los posibles cointegrados encontrados en nuestra colección de genomas, así como también de posibles plásmidos híbridos no descritos a la fecha (p.ej. híbridos IncX1-X3).

Por otra parte, también sería interesante poder estudiar más en profundidad el contenido (número y variantes) de profagos en la colección de genomas, así como analizar con mayor detalle los protoespaciadores de los sistemas CRISPR/Cas, para poder vislumbrar que papel jugaría estos y otros sistemas de defensa en la regulación del contenido de EGM entre los distintos serovares de *S. enterica*.

10. REFERENCIAS

Aakre CD, Phung TN, Huang D and Laub MT. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. *Molecular Cell* 2013; **52**(5):617-28. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.014.

Alba P, Leekitcharoenphon P, Carfora V, Amoroso R, Cordaro G, Di Matteo P, Ianzano A, Iurescia M, Diaconu EL, Study Group EN, Pedersen SK, Guerra B, Hendriksen RS, Franco A and Battisti A. Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microbial Genomics* 2020; **6**(5):e000365. doi: 10.1099/mgen.0.000365.

Albornoz E, Lucero C, Romero G, Quiroga MP, Rapoport M, Guerriero L, Andres P, Rodriguez C, Galas M, Centrón D, Corso A and Petroni A. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria from Argentina. *Microbial Drug Resistance* 2017; **23**(2):177-187. doi: 10.1089/mdr.2016.0033.

Algarni S, Gudeta DD, Han J, Nayak R and Foley SL. Genotypic analyses of IncHI2 plasmids from enteric bacteria. *Scientific Reports* 2024; **14**(1):9802. doi: 10.1038/s41598-024-59870-2.

Ali N, Ali I, Din AU, Akhtar K, He B and Wen R. Integrons in the Age of Antibiotic Resistance: Evolution, Mechanisms, and Environmental Implications: A Review. *Microorganisms* 2024; **12**(12):2579. doi: 10.3390/microorganisms12122579.

Ali SS, Soo J, Rao C, Leung AS, Ngai DH, Ensminger AW and Navarre WW. Silencing by H-NS potentiated the evolution of *Salmonella*. *Public Library of Sciences (PLoS) Pathogens* 2014; **10**(11):e1004500. doi: 10.1371/journal.ppat.1004500.

Allain M, Morel-Journel T, Condamine B, Gibeaux B, Gachet B, Gschwind R, Denamur E and Landraud L. IncC plasmid genome rearrangements influence the vertical and horizontal transmission tradeoff in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2024; **68**(10):e0055424. doi: 10.1128/aac.00554-24.

Alvarez-Martinez CE and Christie PJ. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2009; **73**(4):775-808. doi: 10.1128/MMBR.00023-09.

Álvarez-Ordóñez A, Begley M, Prieto M, Messens W, López M, Bernardo A, and Hill C. *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology (Reading)* 2011; **157**(Pt 12):3268-3281. doi: 10.1099/mic.0.050351-0.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* 1980 16; **289**(1036):321-31. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.

Ambrose SJ, Harmer CJ and Hall RM. Evolution and typing of IncC plasmids contributing to antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Plasmid* 2018; **99**:40-55. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.08.001.

Andres P, Lucero C, Soler-Bistué A, Guerriero L, Albornoz E, Tran T, Zorreguieta A; PMQR Group; Galas M, Corso A, Tolmasky ME and Petroni A. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**(6):2467-75. doi: 10.1128/AAC.01615-12.

- Andrews K, Landeryou T, Sicheritz-Pontén T, and Nale JY.** Diverse Prophage Elements of *Salmonella enterica* Serovars Show Potential Roles in Bacterial Pathogenicity. *Cells* 2024; **13**(6):514. doi: 10.3390/cells13060514.
- Antunes NT and Fisher JF.** Acquired Class D β -Lactamases. *Antibiotics (Basel)* 2014; **3**(3):398-434. doi: 10.3390/antibiotics3030398.
- Ares-Arroyo M, Bernabe-Balas C, Santos-Lopez A, Baquero MR, Prasad KN, Cid D, Martin-Espada C, San Millan A and Gonzalez-Zorn B.** PCR-Based Analysis of ColE1 Plasmids in Clinical Isolates and Metagenomic Samples Reveals Their Importance as Gene Capture Platforms. *Frontiers in Microbiology* 2018; **9**:469. doi: 10.3389/fmicb.2018.00469.
- Arutyunov D and Frost LS.** F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* 2013; **70**(1):18-32. doi: 10.1016/j.plasmid.2013.03.010.
- Ayliffe GA, Lilly HA, and Lowbury EJ.** Decline of the hospital Staphylococcus? Incidence of multiresistant Staph. aureus in three Birmingham hospitals. *Lancet* 1979; **1**(8115):538-41. doi: 10.1016/s0140-6736(79)90955-3.
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A and Zagnitko O.** The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008; **9**:75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Babakhani S and Oloomi M.** Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of Basic Microbiology* 2018; **58**(11):905-917. doi: 10.1002/jobm.201800204.
- Bado I, Cordeiro NF, Robino L, García-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, Gutkind G, Ayala JA and Vignoli R.** Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum β -lactamases and *qnr* alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2010; **36**(5):453-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042
- Bado I, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Betancor L, Caiata L, Seija V, Robino L, Algorta G, Chabalgoity JA, Ayala JA, Gutkind GO and Vignoli R.** First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; **56**(4):2132-4. doi: 10.1128/AAC.05530-11.
- Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, Rieppi G and Vignoli R.** CTX-M-15 in combination with *aac(6)-Ib-cr* is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2016; **6**:5-9. doi: 10.1016/j.jgar.2016.02.001.
- Bado I, Papa-Ezdra R, Cordeiro N, Outeda M, Caiata L, García-Fulgueiras V, Seija V and Vignoli R.** Detection of *qnrVC6*, within a new genetic context, in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* clinical isolate from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2018; **14**:95-98. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.023.
- Balasubramanian R, Im J, Lee JS, Jeon HJ, Mogeni OD, Kim JH, Rakotozandrindrainy R, Baker S and Marks F.** The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2019; **15**(6):1421-1426. doi: 10.1080/21645515.2018.1504717.
- Bao H, Wang S, Zhao JH and Liu SL.** *Salmonella* secretion systems: Differential roles in pathogen-host interactions. *Microbiological Research* 2020; **241**:126591. doi: 10.1016/j.micres.2020.126591.

- Barlow M and Hall BG.** Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**(5):1190-8. doi: 10.1128/AAC.46.5.1190-1198.2002.
- Bekal S, Lefebvre B, Bergevin M and Tremblay C.** CTX-M-15 type ESBL-producing *Salmonella* Havana associated with international adoption in Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 2013; **59**(1):57. doi: 10.1139/cjm-2012-0667.
- Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N and Guédon G.** Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 2014; **38**(4):720-60. doi: 10.1111/1574-6976.12058.
- Bennett PM.** Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; **43**(1):1-4. PMID: 10381094.
- Besser JM.** *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology* 2018; **71**:55-59. doi: 10.1016/j.fm.2017.08.018.
- Betancor L, Pereira M, Martinez A, Giossa G, Fookes M, Flores K, Barrios P, Repiso V, Vignoli R, Cordeiro N, Algorta G, Thomson N, Maskell D, Schelotto F and Chabalgoity JA.** Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; **48**(7):2413-23. doi: 10.1128/JCM.02137-09.
- Bhandari M, Poelstra JW, Kauffman M, Varghese B, Helmy YA, Scaria J and Rajashekara G.** Genomic Diversity, Antimicrobial Resistance, Plasmidome, and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated from Small Specialty Crop Farms Revealed by Whole-Genome Sequencing. *Antibiotics (Basel)* 2023; **12**(11):1637. doi: 10.3390/antibiotics12111637.
- Bhaya D, Davison M and Barrangou R.** CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics* 2011; **45**:273-97. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
- Billard-Pomares T, Fouteau S, Jacquet ME, Roche D, Barbe V, Castellanos M, Bouet JY, Cruveiller S, Médigue C, Blanco J, Clermont O, Denamur E and Branger C.** Characterization of a P1-like bacteriophage carrying an SHV-2 extended-spectrum β -lactamase from an *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; **58**(11):6550-7. doi: 10.1128/AAC.03183-14.
- Blower TR, Short FL, Rao F, Mizuguchi K, Pei XY, Fineran PC, Luisi BF and Salmond GP.** Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. *Nucleic Acids Research* 2012; **40**(13):6158-73. doi: 10.1093/nar/gks231.
- Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C and Sirot J.** A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; **44**(7):1936-42. doi: 10.1128/AAC.44.7.1936-1942.2000.
- Botelho J and Schulenburg H.** The Role of Integrative and Conjugative Elements in Antibiotic Resistance Evolution. *Trends in Microbiology* 2021; **29**(1):8-18. doi: 10.1016/j.tim.2020.05.011.
- Briet A, Helsen N, Delannoy S, Debuiche S, Brisabois A, Midelet G and Granier SA.** NDM-1-producing *Vibrio parahaemolyticus* isolated from imported seafood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018; **73**(9):2578-2579. doi: 10.1093/jac/dky200.

- Brouwer MSM, Jurburg SD, Harders F, Kant A, Mevius DJ, Roberts AP and Bossers A.** The shuffle of IncI1 plasmids is rearranged constantly during different growth conditions. *Plasmid* 2019; **102**:51-55. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.03.003.
- Burmistrz M and Pyrc K.** CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. *Polish Journal of Microbiology* 2015; **64**(3):193-202. PMID: 26638527.
- Bustamante P and Iredell JR.** Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. *Plasmid* 2017; **91**:19-27. doi: 10.1016/j.plasmid.2017.02.006.
- Calarga AP, Gontijo MTP, de Almeida LGP, de Vasconcelos ATR, Nascimento LC, de Moraes Barbosa TMC, de Carvalho Perri TM, Dos Santos SR, Tiba-Casas MR, Marques EGL, Ferreira CM and Brocchi M.** Antimicrobial resistance and genetic background of non-typhoidal *Salmonella enterica* strains isolated from human infections in São Paulo, Brazil (2000-2019). *Brazilian Journal of Microbiology* 2022; **53**(3):1249-1262. doi: 10.1007/s42770-022-00748-8.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K and Madden TL.** BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009; **10**:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- Carattoli A, Aschbacher R, March A, Larcher C, Livermore DM and Woodford N.** Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; **65**(10):2070-5. doi: 10.1093/jac/dkq269.
- Carattoli A, Villa L, Fortini D and García-Fernández A.** Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae. *Plasmid* 2021; **118**:102392. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.12.001.
- Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F and Hasman H.** In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; **58**(7):3895-903. doi: 10.1128/AAC.02412-14.
- Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; **53**(6):2227-38. doi: 10.1128/AAC.01707-08.
- Carraro N, Matteau D, Burrus V and Rodrigue S.** Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mobile Genetic Elements* 2015; **5**(3):1-5. doi: 10.1080/2159256X.2015.1045116.
- Carraro N, Rivard N, Burrus V and Ceccarelli D.** Mobilizable genomic islands, different strategies for the dissemination of multidrug resistance and other adaptive traits. *Mobile Genetic Elements* 2017; **7**(2):1-6. doi: 10.1080/2159256X.2017.1304193.
- Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J and McQuillan JA.** Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*. 2012; **28**(4):464-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btr703.
- Casaux ML, D'Alessandro B, Vignoli R and Fraga M.** Phenotypic and genotypic survey of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from dairy farms in Uruguay. *Frontiers in Veterinary Science* 2023; **10**:1055432. doi: 10.3389/fvets.2023.1055432.
- Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S and Cavard D.** Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007; **71**(1):158-229. doi: 10.1128/MMBR.00036-06.

- Cattoir V, Nordmann P, Silva-Sanchez J, Espinal P and Poirel L.** ISEcp1-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; **52**(8):2929-32. doi: 10.1128/AAC.00349-08.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S and Aarestrup FM.** *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; **53**(2):603-608. doi:10.1128/AAC.00997-08.
- Chan BK, Wong MH, Chan EW and Chen S.** Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Plasmid-Borne *oqxAB* Genes in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiology Spectrum* 2022; **10**(2):e0217021. doi: 10.1128/spectrum.02170-21.
- Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH and Hawkey PM.** Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**(3):630-7. doi: 10.1128/AAC.46.3.630-637.2002.
- Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J and Jin Q.** VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis--10 years on. *Nucleic Acids Research* 2016; **44**(D1):D694-7. doi: 10.1093/nar/gkv1239.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, and Gu J.** FastP: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics* 2018; **34**(17): i884–i890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- Chen W, Fang T, Zhou X, Zhang D, Shi X and Shi C.** IncHI2 Plasmids Are Predominant in Antibiotic-Resistant *Salmonella* Isolates. *Frontiers in Microbiology*. 2016; **7**:1566. doi: 10.3389/fmicb.2016.01566.
- Cheng RA, and Wiedmann M.** The ADP-Ribosylating Toxins of *Salmonella*. *Toxins (Basel)* 2019; **11**(7):416. doi: 10.3390/toxins11070416.
- Chiou CS, Hong YP, Wang YW, Chen BH, Teng RH, Song HY and Liao YS.** Antimicrobial Resistance and Mechanisms of Azithromycin Resistance in Nontyphoidal *Salmonella* Isolates in Taiwan, 2017 to 2018. *Microbiology Spectrum* 2023; **11**(1):e0336422. doi: 10.1128/spectrum.03364-22.
- Chopra I and Roberts M.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 200; **65**(2):232-60
- Chowdhury PR, Fourment M, DeMaere MZ, Monahan L, Merlino J, Gottlieb T, Darling AE and Djordjevic SP.** Identification of a novel lineage of plasmids within phylogenetically diverse subclades of IncHI2-ST1 plasmids. *Plasmid*. 2019; **102**:56-61. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.03.002.
- CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI Supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
- Collis CM, Kim MJ, Stokes HW and Hall RM.** Integron-encoded Intl integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Molecular Microbiology* 2002; **46**(5):1415-27. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03260.x.
- Coluzzi C, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F and Rocha EPC.** Evolution of Plasmid Mobility: Origin and Fate of Conjugative and Nonconjugative Plasmids. *Molecular Biology and Evolution* 2022; **39**(6):msac115. doi: 10.1093/molbev/msac115.
- Coluzzi C, Piscon B, Dérozier S, Chiapello H, and Gal-Mor O.** Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A, Typhi and Typhimurium reveals distinct profiles

of their pangenome, mobile genetic elements, antimicrobial resistance and defense systems repertoire. *Virulence* 2025; **16**(1):2504658. doi: 10.1080/21505594.2025.2504658.

Conte D, Mesa D, Krul D, Bail L, Ito CAS, Palmeiro JK and Dalla-Costa LM. Comparative genomics of IncQ1 plasmids carrying bla_{GES} variants from clinical and environmental sources in Brazil. *Infections, Genetics and Evolution* 2024; **123**:105644. doi: 10.1016/j.meegid.2024.105644.

Coppola N, Cordeiro NF, Trenchi G, Esposito F, Fuga B, Fuentes-Castillo D, Lincopan N, Iriarte A, Bado I and Vignoli R. Imported One-Day-Old Chicks as Trojan Horses for Multidrug-Resistant Priority Pathogens Harboring *mcr-9*, *rmtG*, and Extended-Spectrum β -Lactamase Genes. *Appl Environ Microbiol.* 2022; **88**(2):e0167521. doi: 10.1128/AEM.01675-21.

Coppola N, Freire B, Umpiérrez A, Cordeiro NF, Ávila P, Trenchi G, Castro G, Casaux ML, Fraga M, Zunino P, Bado I and Vignoli R. Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia coli* Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay. *Frontiers in Veterinary Sciences* 2020; **7**:588919. doi: 10.3389/fvets.2020.588919.

Cordeiro NF, Papa-Ezdra R, Traglia G, Bado I, García-Fulgueiras V, Cortinas MN, Caiata L, López-Vega M, Otero A, López M, Hiteguy P, Mogdasy C, and Vignoli R. First Report in the Americas of *S. enterica* Var. Enteritidis Carrying bla_{NDM-1} in a Putatively New Sub-Lineage of IncC2 Plasmids. *Antibiotics (Basel)*. 2025; **14**(6):620. doi: 10.3390/antibiotics14060620.

Cordeiro NF, Iriarte A, Yim L, Betancor L, Chabalgoity JA, Camou T and Vignoli R. Plasmidome of a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolate from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2020; **20**:84-86. doi: 10.1016/j.jgar.2019.11.019.

Cordeiro NF, Nabón A, García-Fulgueiras V, Álvarez M, Sirok A, Camou T and Vignoli R. Analysis of plasmid-mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011-2013. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016; **6**:165-171. doi: 10.1016/j.jgar.2016.06.002.

Cordeiro NF, Robino L, Medina J, Seija V, Bado I, García V, Berro M, Pontet J, López L, Bazet C, Rieppi G, Gutkind G, Ayala JA and Vignoli R. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6)-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; **52**(2):806-7. doi: 10.1128/AAC.00444-07.

Cordeiro NF, Yim L, Betancor L, Cejas D, García-Fulgueiras V, Mota MI, Varela G, Anzalone L, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Chabalgoity JA and Vignoli R. Identification of the first bla_{CMY-2} gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013; **1**(3):143-148. doi: 10.1016/j.jgar.2013.04.003.

Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B, Rocha EPC, Vergnaud G, Gautheret D, and Pourcel C. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research* 2018; **46**(W1):W246-W251. doi: 10.1093/nar/gky425.

Crump JA. Progress in Typhoid Fever Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases* 2019; **68**(Suppl 1):S4-S9. doi: 10.1093/cid/ciy846.

Cummins ML, Hamidian M and Djordjevic SP. *Salmonella* Genomic Island 1 is Broadly Disseminated within Gammaproteobacteriaceae. *Microorganisms* 2020; **8**(2):161. doi: 10.3390/microorganisms8020161.

- Cury J, Touchon M and Rocha EPC.** Integrative and conjugative elements and their hosts: composition, distribution and organization. *Nucleic Acids Research* 2017; **45**(15):8943-8956. doi: 10.1093/nar/gkx607.
- da Silva KC, Cunha MP, Cerdeira L, de Oliveira MG, de Oliveira MC, Gomes CR, Lincopan N, Knöbl T and Moreno AM.** High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2017; **87**(1):64-67. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001.
- Darmon E and Leach DR.** Bacterial genome instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2014; **78**(1):1-39. doi: 10.1128/MMBR.00035-13.
- Daubin V and Szöllösi GJ.** Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2016; **8**(4):a018036. doi: 10.1101/cshperspect.a018036.
- Davies J and Davies D.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; **74**(3):417-33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- De Coster W and Rademakers R.** NanoPack2: population-scale evaluation of long-read sequencing data. *Bioinformatics* 2023; **39**(5): btad311. doi:10.1093/bioinformatics/btad311.
- De Ste Croix M, Vacca I, Kwun MJ, Ralph JD, Bentley SD, Haigh R, Croucher NJ and Oggioni MR.** Phase-variable methylation and epigenetic regulation by type I restriction-modification systems. *FEMS Microbiology Reviews* 2017; **41**(Supp_1):S3-S15. doi: 10.1093/femsre/fux025.
- Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N and van der Meer JR.** The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiology Reviews* 2017; **41**(4):512-537. doi: 10.1093/femsre/fux008.
- Deng W, Quan Y, Yang S, Guo L, Zhang X, Liu S, Chen S, Zhou K, He L, Li B, Gu Y, Zhao S and Zou L.** Antibiotic Resistance in *Salmonella* from Retail Foods of Animal Origin and Its Association with Disinfectant and Heavy Metal Resistance. *Microbial Drug Resistance* 2018; **24**(6):782-791. doi: 10.1089/mdr.2017.0127.
- Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y and Yu G.** Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2015; **14**:45. doi: 10.1186/s12941-015-0100-6.
- Di Pilato V, Papa-Ezdra R, Chiarelli A, García-Fulgueiras V, Pallecchi L and Vignoli R.** Characterization of the first *bla*_{CTX-M-14}/*ermB*-carrying IncI1 plasmid from Latin America. *Plasmid*. 2019; **102**:1-5. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.02.001.
- DiMarzio M, Shariat N, Kariyawasam S, Barrangou R and Dudley EG.** Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Associates with CRISPR Sequence Type. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**(9):4282-4289. doi: 10.1128/AAC.00913-13.
- Dimitriu T, Szczelkun MD, and Westra ER.** Various plasmid strategies limit the effect of bacterial restriction-modification systems against conjugation. *Nucleic Acids Research* 2024; **52**(21):12976-12986. doi: 10.1093/nar/gkae896.
- Dolejska M and Papagiannitsis CC.** Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid*. 2018; **99**:99-111. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.09.010.
- Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L and Carattoli A.** Characterization of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**(2):333-9. doi: 10.1093/jac/dks387.

- Dorman CJ.** H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. *Plasmid* 2014; **75**:1-11. doi: 10.1016/j.plasmid.2014.06.004.
- Dortet L, Nordmann P and Poirel L.** Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; **56**(4):1693-7. doi: 10.1128/AAC.05583-11.
- Dortet L, Poirel L and Nordmann P.** Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Research International*; **2014**:249856. doi: 10.1155/2014/249856.
- Dos Santos AMP, Ferrari RG, and Conte-Junior CA.** Virulence Factors in *Salmonella* Typhimurium: The Sagacity of a Bacterium. *Current Microbiology* 2019; **76**(6):762-773. doi: 10.1007/s00284-018-1510-4.
- Drijver EPMD, Stohr JJM, Verweij JJ, Verhulst C, Velkers FC, Stegeman A, Bergh MFQKD, Kluytmans JAJW and Group IS.** Limited Genetic Diversity of *bla*_{CMY-2}-Containing Inc11-pST12 Plasmids from Enterobacteriaceae of Human and Broiler Chicken Origin in The Netherlands. *Microorganisms* 2020; **8**(11):1755. doi: 10.3390/microorganisms8111755.
- Dy RL, Przybilski R, Semeijn K, Salmond GP and Fineran PC.** A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(7):4590-605. doi: 10.1093/nar/gkt1419.
- Eller C, Leistner R, Guerra B, Fischer J, Wendt C, Rabsch W, Werner G and Pfeifer Y.** Emergence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2014; **69**(2):562-4. doi: 10.1093/jac/dkt387.
- Emond-Rheault JG, Hamel J, Jeukens J, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Tamber S, Malo D, Franz E, Burnett E, Daigle F, Arya G, Sanderson K, Wiedmann M, Slawson RM, Weadge JT, Stephan R, Bekal S, Gruenheid S, Goodridge LD and Levesque RC.** The *Salmonella enterica* Plasmidome as a Reservoir of Antibiotic Resistance. *Microorganisms* 2020; **8**(7):1016. doi: 10.3390/microorganisms8071016.
- Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, Rasko DA, Kokorina G, Fayolle C, Lindler LE, Carniel E and Ravel J.** The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genetics* 2007; **3**(8):e142. doi: 10.1371/journal.pgen.0030142
- Escudero JA, Loot C, Nivina A and Mazel D.** The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiology Spectrum* 2015; **3**(2):MDNA3-0019-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014.
- European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control.** The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019-2020. *EFSA Journal* 2022; **20**(3):e07209. doi: 10.2903/j.efsa.2022.7209.
- Falgenhauer L, Zur Nieden A, Harpel S, Falgenhauer J and Domann E.** Clonal CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST-949 Are Present in German Surface Water. *Frontiers in Microbiology* 2021; **12**:617349. doi: 10.3389/fmicb.2021.617349.
- Fang LX, Li XP, Li L, Chen MY, Wu CY, Li LL, Liao XP, Liu YH and Sun J.** *ISEcp1*-mediated transposition of chromosome-borne *bla*_{CMY-2} into an endogenous ColE1-like plasmid in *Escherichia coli*. *Infection and Drug Resistance* 2018; **11**:995-1005. doi: 10.2147/IDR.S159345.
- Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu CH, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J,**

- Folster JP and Klimke W.** Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2019; **63**(11):e00483-19. doi: 10.1128/AAC.00483-19.
- Feng Y, Lin E, Zou S, Chen CL and Chiu CH.** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Sendai shows H antigen convergence with *S. Miami* and recent divergence from *S. Paratyphi A*. *BMC Genomics*. 2019; **20**(1):398. doi: 10.1186/s12864-019-5798-7.
- Feng Y, Liu J, Li YG, Cao FL, Johnston RN, Zhou J, Liu GR and Liu SL.** Inheritance of the *Salmonella* virulence plasmids: mostly vertical and rarely horizontal. *Infections, Genetics and Evolution* 2012; **12**(5):1058-63. doi: 10.1016/j.meegid.2012.03.004.
- Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A Jr and Darini AL.** Inc11/ST113 and Inc11/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2014; **80**(4):304-6. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.012.
- Fiegen U, Klein G, de Jong A and Kehrenberg C.** Detection of a Novel *qnrB19*-Carrying Plasmid Variant Mediating Decreased Fluoroquinolone Susceptibility in *Salmonella enterica* Serovar Hadar. *Microbial Drug Resistance* 2017; **23**(3):280-284. doi: 10.1089/mdr.2016.0067.
- Figueiredo R, Card R, Nunes C, AbuOun M, Bagnall MC, Nunez J, Mendonça N, Anjum MF and da Silva GJ.** Virulence Characterization of *Salmonella enterica* by a New Microarray: Detection and Evaluation of the Cytolethal Distending Toxin Gene Activity in the Unusual Host *S. Typhimurium*. *PLoS One*. 2015; **10**(8):e0135010. doi: 10.1371/journal.pone.0135010.
- Foley SL, Kaldhove PR, Ricke SC and Han J.** Incompatibility Group I1 (IncI1) Plasmids: Their Genetics, Biology, and Public Health Relevance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2021; **85**(2):e00031-20. doi: 10.1128/MMBR.00031-20.
- Folster JP, Rickert R, Barzilay EJ and Whichard JM.** Identification of the aminoglycoside resistance determinants *armA* and *rmtC* among non-Typhi *Salmonella* isolates from humans in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; **53**(10):4563-4. doi: 10.1128/AAC.00656-09.
- Folster JP, Pecic G, Bolcen S, Theobald L, Hise K, Carattoli A, Zhao S, McDermott PF, and Whichard JM.** Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from humans in the United States. *Foodborne Pathogens and Disease* 2010; **7**(2):181-7. doi: 10.1089/fpd.2009.0376.
- Fortini D, García-Fernández A, Veldman K, Mevius D and Carattoli A.** Novel genetic environment of plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrB2* in *Salmonella Bredeney* from poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; **64**(6):1332-4. doi: 10.1093/jac/dkp356.
- Fozo EM, Makarova KS, Shabalina SA, Yutin N, Koonin EV and Storz G.** Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. *Nucleic Acids Research* 2010; **38**(11):3743-59. doi: 10.1093/nar/gkq054.
- Frost LS, Leplae R, Summers AO and Toussaint A.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews, Microbiology* 2005; **3**(9):722-32. doi: 10.1038/nrmicro1235.
- Garbarg-Chenon A, Godard V, Labia R and Nicolas JC.** Nucleotide sequence of SHV-2 beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990; **34**(7):1444-6. doi: 10.1128/AAC.34.7.1444.

- García-Fernández A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A and Carattoli A.** Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **61**(6):1229-33. doi: 10.1093/jac/dkn131.
- Garcia-Fulgueiras V, Araujo L, Bado I, Cordeiro NF, Mota MI, Laguna G, Algorta G and Vignoli R.** Allodemic distribution of plasmids co-harboring *bla*_{CTX-M-15}/*aac*(6')-*Ib-cr/qnrB* in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β-lactamases in Uruguay's paediatric hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2017; **9**:68-73. doi: 10.1016/j.jgar.2017.01.008.
- Garcillán-Barcia MP and de la Cruz F.** Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* 2008; **60**(1):1-18. doi: 10.1016/j.plasmid.2008.03.002.
- Garcillán-Barcia MP, Francia MV and de la Cruz F.** The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews* 2009; **33**(3):657-87. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x.
- Gerdes K.** Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *Journal of Bacteriology*. 2000; **182**(3):561-72. doi: 10.1128/JB.182.3.561-572.2000.
- Gibani MM, Britto C and Pollard AJ.** Typhoid and paratyphoid fever: a call to action. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2018; **31**(5):440-448. doi: 10.1097/QCO.0000000000000479.
- Gokulan K, Khare S, Rooney AW, Han J, Lynne AM, and Foley SL.** Impact of plasmids, including those encoding VirB4/D4 type IV secretion systems, on *Salmonella enterica* serovar Heidelberg virulence in macrophages and epithelial cells. *PLoS One* 2013; **8**(10):e77866. doi: 10.1371/journal.pone.0077866.
- Golberg D, Kroupitski Y, Belausov E, Pinto R and Sela S.** *Salmonella* Typhimurium internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology* 2011; **145**: 250-257. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.031.
- Gomes C, Martínez-Puchol S, Palma N, Horna G, Ruiz-Roldán L, Pons MJ and Ruiz J.** Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology* 2017; **43**(1):1-30. doi: 10.3109/1040841X.2015.1136261.
- Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, Tang N, Rozenberg FD, Ahmad M, Park H, Lopatkin AJ and Uhlemann AC.** Population structure of *bla*_{KPC}-harbouring IncN plasmids at a New York City medical centre and evidence for multi-species horizontal transmission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2022; **77**(7):1873-1882. doi: 10.1093/jac/dkac114.
- Gonzales AM, Wilde S and Roland KL.** New Insights into the Roles of Long Polar Fimbriae and Stg Fimbriae in *Salmonella* Interactions with Enterocytes and M Cells. *Infection and Immunity* 2017; **85**(9):e00172-17. doi: 10.1128/IAI.00172-17.
- Groisman EA and Choi J.** Advancing evolution: Bacteria break down gene silencer to express horizontally acquired genes. *Bioessays* 2023; **45**(10):e2300062. doi: 10.1002/bies.202300062.
- Grossman TH.** Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2016; **6**(4):a025387. doi: 10.1101/cshperspect.a025387.
- Guenther S, Grobbel M, Beutlich J, Bethe A, Friedrich ND, Goedecke A, Lübke-Becker A, Guerra B, Wieler LH and Ewers C.** CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. *Environmental Microbiology Reports* 2010; **2**(5):641-5. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00148.x.

- Guglielmini J, de la Cruz F and Rocha EP.** Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Molecular Biology and Evolution* 2013; **30**(2):315-31. doi: 10.1093/molbev/mss221.
- Gunell M, Kotilainen P, Jalava J, Huovinen P, Siitonen A and Hakanen AJ.** In vitro activity of azithromycin against nontyphoidal *Salmonella enterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**(8):3498-501. doi: 10.1128/AAC.01678-09.
- Guo Q, Su J, McElheny CL, Stoesser N, Doi Y and Wang M.** IncX2 and IncX1-X2 Hybrid Plasmids Coexisting in a FosA6-Producing *Escherichia coli* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017; **61**(7):e00536-17. doi: 10.1128/AAC.00536-17.
- Guzman-Otazo J, Joffré E, Agramont J, Mamani N, Jutkina J, Boulund F, Hu YOO, Jumilla-Lorenz D, Farewell A, Larsson DGJ, Flach CF, Iñiguez V and Sjöling Å.** Conjugative transfer of multi-drug resistance IncN plasmids from environmental waterborne bacteria to *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2022; **13**:997849. doi: 10.3389/fmicb.2022.997849.
- Gyohda A, Furuya N, Ishiwa A, Zhu S and Komano T.** Structure and function of the shufflon in plasmid r64. *Advances in Biophysics* 2004; **38**(Complete):183-213. PMID: 15476899.
- Hall AM, Gollan B and Helaine S.** Toxin-antitoxin systems: reversible toxicity. *Current Opinion in Microbiology* 2017; **36**:102-110. doi: 10.1016/j.mib.2017.02.003.
- Hall RM, Holmes AJ, Roy PH and Stokes HW.** What are superintegrons? *Nature Reviews, Microbiology*; **5**(2):C1; author reply C2. doi: 10.1038/nrmicro1462-c1.
- Han J, Aljahdali N, Zhao S, Tang H, Harbottle H, Hoffmann M, Frye JG and Foley SL.** Infection biology of *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus* 2024; **12**(1):eesp00012023. doi: 10.1128/ecosalplus.esp-0001-2023.
- Han J, Pendleton SJ, Deck J, Singh R, Gilbert J, Johnson TJ, Sanad YM, Nayak R and Foley SL.** Impact of co-carriage of IncA/C plasmids with additional plasmids on the transfer of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 2018; **271**:77-84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.018.
- Han X, Du XD, Southey L, Bulach DM, Seemann T, Yan XX, Bannam TL and Rood JI.** Functional analysis of a bacitracin resistance determinant located on ICECp1, a novel Tn916-like element from a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015; **59**(11):6855-65. doi: 10.1128/AAC.01643-15.
- Haraga A, Ohlson MB, and Miller SI.** Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews, Microbiology* 2008; **6**(1):53-66. doi: 10.1038/nrmicro1788.
- Harmer CJ and Hall RM.** IS26-Mediated Formation of Transposons Carrying Antibiotic Resistance Genes. *mSphere* 2016; **1**(2):e00038-16. doi: 10.1128/mSphere.00038-16.
- Harmer CJ and Hall RM.** IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-*aphA1a* Translocatable Unit. *mBio* 2015; **6**(6):e01866-15. doi: 10.1128/mBio.01866-15.
- Harmer CJ and Hall RM.** pRMH760, a precursor of A/C₂ plasmids carrying *bla*CMY and *bla*NDM genes. *Microbial Drug Resistance* 2014; **20**(5):416-23. doi: 10.1089/mdr.2014.0012.
- Harmer CJ and Hall RM.** The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid*. 2015b; **80**:63-82. doi: 10.1016/j.plasmid.2015.04.003.
- Harmer CJ, Moran RA and Hall RM.** Movement of IS26-associated antibiotic resistance genes occurs via a translocatable unit that includes a single IS26 and preferentially inserts adjacent to another IS26. *mBio*. 2014; **5**(5):e01801-14. doi: 10.1128/mBio.01801-14.

- Harris RL, Hombs V and Silverman PM.** Evidence that F-plasmid proteins TraV, TraK and TraB assemble into an envelope-spanning structure in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 2001; **42**(3):757-66. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02667.x.
- He S, Hickman AB, Varani AM, Siguier P, Chandler M, Dekker JP and Dyda F.** Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *mBio* 2015; **6**(3):e00762. doi: 10.1128/mBio.00762-15.
- Hennequin C, Forestier C, Traore O, Debroas D and Bricheux G.** Plasmidome analysis of a hospital effluent biofilm: Status of antibiotic resistance. *Plasmid* 2022; **122**:102638. doi: 10.1016/j.plasmid.2022.102638.
- Hickman AB and Dyda F.** DNA Transposition at Work. *Chemical Review* 2016; **116**(20):12758-12784. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00003.
- Hooban B, Fitzhenry K, O'Connor L, Miliotis G, Joyce A, Chueiri A, Farrell ML, DeLappe N, Tuohy A, Cormican M and Morris D.** A Longitudinal Survey of Antibiotic-Resistant Enterobacteriales in the Irish Environment, 2019-2020. *Science of the Total Environment* 2022; **828**:154488. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154488.
- Huang SH, Chen YH, Fu Q, Stins M, Wang Y, Wass C and Kim KS.** Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity* 1999; **67**(5):2103-9. doi: 10.1128/IAI.67.5.2103-2109.1999.
- Huang Y, Ma X, Zeng S, Fu L, Xu H and Li X.** Emergence of a *Salmonella* Rissen ST469 clinical isolate carrying bla_{NDM-13} in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2022; **12**:936649. doi: 10.3389/fcimb.2022.936649.
- Huguet KT, Gonnet M, Doublet B and Cloeckaert A.** A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1. *Scientific Reports* 2016; **6**:32285. doi: 10.1038/srep32285.
- Hurtado-Escobar GA, Grépinet O, Raymond P, Abed N, Velge P and Virlogeux-Payant I.** H-NS is the major repressor of *Salmonella* Typhimurium Pef fimbriae expression. *Virulence* 2019; **10**(1):849-867. doi: 10.1080/21505594.2019.1682752.
- Hüttener M, Paytubi S and Juárez A.** Success in incorporating horizontally transferred genes: the H-NS protein. *Trends in Microbiology* 2015; **23**(2):67-9. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.009.
- Ibarra JA, and Steele-Mortimer O.** Salmonella--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology* 2009; **11**(11):1579-86. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01368.x.
- Ikegaya K, Aoki K, Komori K, Ishii Y and Tateda K.** Analysis of the stepwise acquisition of bla_{CTX-M-2} and subsequent acquisition of either bla_{IMP-1} or bla_{IMP-6} in highly conserved IncN-pST5 plasmids. *JAC-Antimicrobial Resistance* 2023; **5**(5):dlad106. doi: 10.1093/jacamr/dlad106.
- Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI and Weill FX.** Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. *Research in Microbiology* 2014; **165**: 526-530. doi: 10.1016/j.resmic.2014.07.004.
- Ivanova M, Ovsepiyan A, Leekitcharoenphon P, Seyfarth AM, Mordhorst H, Otani S, Koeberl-Jelovcan S, Milanov M, Kompes G, Liapi M, Černý T, Vester CT, Perrin-Guyomard A, Hammerl JA, Grobbel M, Valkanou E, Jánosi S, Slowey R, Alba P, Carfora V, Avsejenko J, Pereckiene A, Claude D, Zerafa R, Veldman KT, Boland C, Garcia-Graells C, Wattiau P, Butaye P, Zając M, Amaro A, Clemente L, Vaduva AM, Romascu LM, Milita**

- NM, Mojžišová A, Zdovc I, Escribano MJZ, De Frutos Escobar C, Overesch G, Teale C, Loneragan GH, Guerra B, Beloeil PA, Brown AMV, Hendriksen RS, Bortolaia V and Kjeldgaard JS.** Azithromycin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* from food-producing animals and meat in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2024; **79**(7):1657-1667. doi: 10.1093/jac/dkae161.
- Jacoby GA, Corcoran MA and Hooper DC.** Protective effect of Qnr on agents other than quinolones that target DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015; **59**(11):6689-95. doi: 10.1128/AAC.01292-15.
- Jacoby GA, Griffin CM and Hooper DC.** *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; **55**(11):4979-84. doi: 10.1128/AAC.05187-11.
- Jibril AH, Okeke IN, Dalsgaard A, Menéndez VG and Olsen JE.** Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance and Resistance Plasmids in *Salmonella* Serovars from Poultry in Nigeria. *Antibiotics (Basel)* 2021; **10**(2):99. doi: 10.3390/antibiotics10020099.
- Johnson R, Mylona E, and Frankel G.** Typhoidal *Salmonella*: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular Microbiology* 2018; **20**(9):e12939. doi: 10.1111/cmi.12939.
- Johnson TJ, Bielak EM, Fortini D, Hansen LH, Hasman H, Debroy C, Nolan LK and Carattoli A.** Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid* 2012; **68**(1):43-50. doi: 10.1016/j.plasmid.2012.03.001.
- Johnson TJ, Singer RS, Isaacson RE, Danzeisen JL, Lang K, Kobluk K, Rivet B, Borewicz K, Frye JG, Englen M, Anderson J and Davies PR.** In Vivo Transmission of an IncA/C Plasmid in *Escherichia coli* Depends on Tetracycline Concentration, and Acquisition of the Plasmid Results in a Variable Cost of Fitness. *Applied and Environmental Microbiology* 2015; **81**(10):3561-70. doi: 10.1128/AEM.04193-14.
- Jurénas D, Fraikin N, Goormaghtigh F and Van Melderen L.** Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology* 2022; **20**(6):335-350. doi: 10.1038/s41579-021-00661-1.
- Kaldhone PR, Carlton A, Aljehdali N, Khajanchi BK, Sanad YM, Han J, Deck J, Ricke SC and Foley SL.** Evaluation of Incompatibility Group I1 (Incl1) Plasmid-Containing *Salmonella enterica* and Assessment of the Plasmids in Bacteriocin Production and Biofilm Development. *Frontiers in Veterinary Science* 2019; **6**:298. doi: 10.3389/fvets.2019.00298.
- Kaldhone PR, Han J, Deck J, Khajanchi B, Nayak R, Foley SL and Ricke SC.** Evaluation of the Genetics and Functionality of Plasmids in Incompatibility Group I1-Positive *Salmonella enterica*. *Foodborne Pathogens and Disease* 2018; **15**(3):168-176. doi: 10.1089/fpd.2017.2332.
- Karim A, Poirel L, Nagarajan S and Nordmann P.** Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiology Letters* 2001 24; **201**(2):237-41. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10762.x
- Kassambara A, 2017.** *Practical Guide to Principal Component Methods in R: PCA, M(C)A, FAMD, MFA, HCPC, Factor Analysis* (<https://cran.r-project.org/package=factoextra>).
- Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Virdi JS and Gulati P.** Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2018; **51**(2):167-176. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004.
- Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, Jové T, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Ueshimo T, Miura T, Sueda T, Onodera M, Yokozaki M,**

- Hattori M, Ohge H, Sugai M.** Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015; **59**(2):1356-9. doi: 10.1128/AAC.04759-14.
- Khajanchi BK, Hasan NA, Choi SY, Han J, Zhao S, Colwell RR, Cerniglia CE, and Foley SL.** Comparative genomic analysis and characterization of incompatibility group FIB plasmid encoded virulence factors of *Salmonella enterica* isolated from food sources. *BMC Genomics* 2017; **18**(1):570. doi: 10.1186/s12864-017-3954-5.
- Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, and Wiedemann B.** Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985; **28**(2):302-7. doi: 10.1128/AAC.28.2.302.
- Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, Schwarz S, and Jurke A.** Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection* 2018; **24**(12):1241-1250. doi: 10.1016/j.cmi.2018.04.004.
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y and Pevzner PA.** Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*. 2019; **37**(5):540-546. doi: 10.1038/s41587-019-0072-8.
- Koonin EV, Makarova KS and Zhang F.** Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* 2017; **37**:67-78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008.
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH and Phillippy AM.** Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Research* 2017; **27**(5):722-736. doi: 10.1101/gr.215087.116.
- Kotsakis SD, Tzouveleakis LS, Lebessi E, Doudoulakakis A, Bouli T, Tzelepi E and Miriagou V.** Characterization of a mobilizable IncQ plasmid encoding cephalosporinase CMY-4 in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2015; **59**(5):2964-6. doi: 10.1128/AAC.05017-14.
- Krin E, Cambray G and Mazel D.** The superintegron integrase and the cassette promoters are co-regulated in *Vibrio cholerae*. *Public Library of Sciences (PLoS) One* 2014; **9**(3):e91194. doi: 10.1371/journal.pone.0091194.
- Kubasova T, Cejkova D, Matiasovicova J, Sekelova Z, Polansky O, Medvecký M, Rychlík I and Juricova H.** Antibiotic Resistance, Core-Genome and Protein Expression in IncHI1 Plasmids in *Salmonella* Typhimurium. *Genome Biology and Evolution* 2016; **8**(6):1661-71. doi: 10.1093/gbe/evw105.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 2018; **35**(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kushwaha SK, Bhavesh NLS, Abdella B, Lahiri C and Marathe SA.** The phylogenomics of CRISPR-Cas system and revelation of its features in *Salmonella*. *Scientific Reports* 2020; **10**(1):21156. doi: 10.1038/s41598-020-77890-6.
- Lallement C, Pasternak C, Ploy MC and Jové T.** The Role of ISCR1-Borne POUT Promoters in the Expression of Antibiotic Resistance Genes. *Frontiers in Microbiology* 2018; **9**:2579. doi: 10.3389/fmicb.2018.02579.
- Lamichhane B, Mawad AMM, Saleh M, Kelley WG, Harrington PJ 2nd, Lovestad CW, Amezcuca J, Sarhan MM, El Zowalaty ME, Ramadan H, Morgan M and Helmy YA.** Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to

Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics* (Basel) 2024; **13**(1):76. doi: 10.3390/antibiotics13010076.

LaRock DL, Chaudhary A, and Miller SI. Salmonellae interactions with host processes. *Nature Reviews, Microbiology* 2015; **13**(4):191-205. doi: 10.1038/nrmicro3420.

Lartigue MF, Poirel L, Aubert D and Nordmann P. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**(4):1282-6. doi: 10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006.

Lê S, Josse J, and Husson F. *FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis*. *Journal of Statistical Software* 2008; **25**(1), 1–18. doi.org/10.18637/jss.v025.i01.

Le Xuan A, Hsu FY, Hsueh PR, Lin WH, Chen HH, Chiou MT and Lin CN. Antimicrobial resistance profile in *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from diseased pigs in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2024; **57**(4):660-664. doi: 10.1016/j.jmii.2024.04.005.

Lee S, Lee DK. What is the proper way to apply the multiple comparison test? *Korean Journal of Anesthesiology* 2018; **71**(5):353-360. doi: 10.4097/kja.d.18.00242.

Leekitcharoenphon P, Hendriksen RS, Le Hello S, Weill FX, Baggesen DL, Jun SR, Ussery DW, Lund O, Crook DW, Wilson DJ and Aarestrup FM. Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology* 2016; **82**: 2516-2526. doi: 10.1128/AEM.03821-15.

Lei CW, Zhang AY, Liu BH, Wang HN, Guan ZB, Xu CW, Xia QQ, Cheng H, Zhang DD. Molecular characteristics of *Salmonella* genomic island 1 in *Proteus mirabilis* isolates from poultry farms in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; **58**(12):7570-2. doi: 10.1128/AAC.03992-14.

Lei CW, Zhang AY, Wang HN, Liu BH, Yang LQ and Yang YQ. Characterization of SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements in *Proteus mirabilis* Isolates from Food-Producing Animals in China. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* 2016; **60**(3):1935-8. doi: 10.1128/AAC.02852-15.

Lewis JS, Herrera M, Wickes B, Patterson JE and Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007; **51**(11):4015-21. doi: 10.1128/AAC.00576-07.

Li JJ, Lee CS, Sheng JF and Doi Y. Complete sequence of a conjugative IncN plasmid harboring *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-12}, and *qnrS1* from an *Escherichia coli* sequence type 648 strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014 Nov; **58**(11):6974-7. doi: 10.1128/AAC.03632-14.

Li L, Liao X, Yang Y, Sun J, Li L, Liu B, Yang S, Ma J, Li X, Zhang Q and Liu Y. Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; **68**(10):2263-8. doi: 10.1093/jac/dkt209.

Liang H, Li X and Yan H. Identification of a Novel IncHI1B Plasmid in MDR *Klebsiella pneumoniae* 200 from Swine in China. *Antibiotics* (Basel) 2022; **11**(9):1225. doi: 10.3390/antibiotics11091225.

Liao CH, Hsueh PR, Jacoby GA and Hooper DC. Risk factors and clinical characteristics of patients with *qnr*-positive *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013; **68**(12):2907-14. doi: 10.1093/jac/dkt295.

- Liao XP, Xia J, Yang L, Li L, Sun J, Liu YH and Jiang HX.** Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Frontiers in Microbiology*. 2015; **15**(6):1136. doi: 10.3389/fmicb.2015.01136.
- Liebana E, Batchelor M, Torres C, Briñas L, Lagos LA, Abdalhamid B, Hanson ND and Martinez-Urtaza J.** Pediatric infection due to multiresistant *Salmonella enterica* serotype Infantis in Honduras. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**(10):4885-8. doi: 10.1128/JCM.42.10.4885-4888.2004.
- Lin H, Diarra MS, Jia G and Zhao X.** Detection of plasmids in *Salmonella* from poultry and investigating the potential horizontal transfer of antimicrobial resistance and virulence genes: Plasmid Transfer of Resistance and Virulence. *Poultry Science* 2025; **104**(1):104591. doi: 10.1016/j.psj.2024.104591.
- Liu F, Barrangou R, Gerner-Smidt P, Ribot EM, Knabel SJ and Dudley EG.** Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; **77**(6):1946-56. doi: 10.1128/AEM.02625-10.
- Liu M, Zhu K, Li X, Han Y, Yang C, Liu H, Du X, Xu X, Yang H, Song H, Qiu S and Xiang Y.** Genetic characterization of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from an infant with concurrent resistance to ceftriaxone, ciprofloxacin and azithromycin. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2023; **35**:252-256. doi: 10.1016/j.jgar.2023.09.016.
- Loenen WA and Raleigh EA.** The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(1):56-69. doi: 10.1093/nar/gkt747.
- Loftie-Eaton W and Rawlings DE.** Diversity, biology and evolution of IncQ-family plasmids. *Plasmid* 2012; **67**(1):15-34. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.10.001.
- Lopatina A, Tal N, and Sorek R.** Abortive Infection: Bacterial Suicide as an Antiviral Immune Strategy. *Annual Review of Virology* 2020; **7**(1):371-384. doi: 10.1146/annurev-virology-011620-040628.
- Lopes AC, Veras DL, Lima AM, Melo Rde C and Ayala J.** bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010; **105**(2):163-7. doi: 10.1590/s0074-02762010000200009.
- Lorenzo D.** Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. *Microorganisms* 2019; **7**(9):278. doi: 10.3390/microorganisms7090278.
- Lou L, Zhang P, Piao R, and Wang Y.** *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2019; **9**:270. doi: 10.3389/fcimb.2019.00270.
- Lu X, Zeng M, Zhang N, Wang M, Gu B, Li J, Jin H, Xiao W, Li Z, Zhao H, Zhou H, Li Z, Xu J, Xu X and Kan B.** Prevalence of 16S rRNA Methylation Enzyme Gene *armA* in *Salmonella* From Outpatients and Food. *Frontiers in Microbiology* 2021; **12**:663210. doi: 10.3389/fmicb.2021.663210.
- Lupo A, Haenni M, Saras E, Gradin J, Madec JY and Börjesson S.** Is bla_{CTX-M-1} Riding the Same Plasmid Among Horses in Sweden and France? *Microbial Drug Resistance* 2018. doi: 10.1089/mdr.2017.0412.

- Ma Y, Pirolo M, Jana B, Mebus VH and Guardabassi L.** The intrinsic macrolide resistome of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2024; **68**(8):e0045224. doi: 10.1128/aac.00452-24.
- Macedo-Viñas M, Cordeiro NF, Bado I, Herrera-Leon S, Vola M, Robino L, Gonzalez-Sanz R, Mateos S, Schelotto F, Algorta G, Ayala JA, Echeita A and Vignoli R.** Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases* 2009; **13**(3):342-8. doi: 10.1016/j.ijid.2008.07.012.
- Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R and Koonin EV.** An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 2015; **13**(11):722-36. doi: 10.1038/nrmicro3569.
- Mambu J, Barilleau E, Fragnet-Trapp L, Le Vern Y, Olivier M, Sadrin G, Grépinet O, Taieb F, Velge P, and Wiedemann A.** Rck of *Salmonella* Typhimurium Delays the Host Cell Cycle to Facilitate Bacterial Invasion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020; **10**:586934. doi: 10.3389/fcimb.2020.586934.
- Mamontov V, Martynov A, Morozova N, Bukatin A, Staroverov DB, Lukyanov KA, Ispolatov Y, Semenova E and Severinov K.** Persistence of plasmids targeted by CRISPR interference in bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A. (PNAS)* 2022; **119**(15):e2114905119. doi: 10.1073/pnas.2114905119.
- Manageiro V, Clemente L, Jones-Dias D, Albuquerque T, Ferreira E and Caniça M.** CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* in Dolphin, Portugal. *Emerging Infectious Diseases* 2015; **21**(12):2249-51. doi: 10.3201/eid2112.141963.
- Martínez M, Rizzuto I, and Molina R.** Knowing Our Enemy in the Antimicrobial Resistance Era: Dissecting the Molecular Basis of Bacterial Defense Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 2024; **25**(9):4929. doi: 10.3390/ijms25094929.
- Mattioni Marchetti V, Hrabak J and Bitar I.** Fosfomycin resistance mechanisms in *Enterobacterales*: an increasing threat. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2023; **13**:1178547. doi: 10.3389/fcimb.2023.1178547.
- McDermott PF, Zhao S and Tate H.** Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiology Spectrum* 2018; **6**(4):10.1128/microbiolspec.arba-0014-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0014-2017.
- McEwen SA and Collignon PJ.** Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum* 2018; **6**(2):10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017.
- McHugh ML.** Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia Medica (Zagreb)* 2012; **22**(3):276-82. PMID: 23092060.
- McMillan EA, Jackson CR and Frye JG.** Transferable Plasmids of *Salmonella enterica* Associated With Antibiotic Resistance Genes. *Frontiers in Microbiology* 2020; **11**:562181. doi: 10.3389/fmicb.2020.562181.
- Mechesso AF, Na SH, Moon DC, Kim SJ, Choi JH, Song HJ, Yoon SS and Lim SK.** Antibiotic Resistance Profiles and Molecular Characteristics of *bla*_{CTX-M-15}-Carrying *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates from Healthy and Diseased Chickens in Korea. *Foodborne Pathogens and Disease* 2022; **19**(10):663-674. doi: 10.1089/fpd.2022.0033.

- Medalla F, Gu W, Mahon BE, Judd M, Folster J, Griffin PM and Hoekstra RM.** Estimated Incidence of Antimicrobial Drug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Infections, United States, 2004-2012. *Emerging Infectious Diseases* 2016; **23**(1):29-37. doi: 10.3201/eid2301.
- Medeiros AA, Cohenford M and Jacoby GA.** Five novel plasmid-determined beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1985; **27**(5):715-9. doi: 10.1128/AAC.27.5.715.
- Meiring JE, Khanam F, Basnyat B, Charles RC, Crump JA, Debellut F, Holt KE, Kariuki S, Mugisha E, Neuzil KM, Parry CM, Pitzer VE, Pollard AJ, Qadri F and Gordon MA.** Typhoid fever. *Nature Reviews. Disease Primers* 2023; **9**(1):71. doi: 10.1038/s41572-023-00480-z.
- Meng L, Liu Z, Liu C, Li C, Shen H and Cao X.** The distribution characteristics of global *bla*_{OXA}-carrying *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infectious Disease* 2023; **23**(1):182. doi: 10.1186/s12879-023-08156-5.
- Moreno-Switt AI, Pezoa D, Sepúlveda V, González I, Rivera D, Retamal P, Navarrete P, Reyes-Jara A and Toro M.** Transduction as a Potential Dissemination Mechanism of a Clonal *qnrB19*-Carrying Plasmid Isolated From *Salmonella* of Multiple Serotypes and Isolation Sources. *Frontiers in Microbiology* 2019; **10**:2503. doi: 10.3389/fmicb.2019.02503.
- Mruk I and Kobayashi I.** To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(1):70-86. doi: 10.1093/nar/gkt711.
- Navarre WW, McClelland M, Libby SJ and Fang FC.** Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes and Development* 2007; **21**(12):1456-71. doi: 10.1101/gad.1543107.
- Néron B; Denise R, Coluzzi C, Touchon M, Rocha EPC, and Abby SS.** MacSyFinder v2: Improved modelling and search engine to identify molecular systems in genomes. *Peer Community Journal* 2023; **3**:e28
- Nicolas E, Lambin M, Dandoy D, Galloy C, Nguyen N, Oger CA and Hallet B.** The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology Spectrum* 2015; **3**(4). doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0060-2014. doi: 10.24072/pcjournal.250
- Nohejl T, Valcek A, Papousek I, Palkovicova J, Wailan AM, Pratova H, Minoia M and Dolejska M.** Genomic analysis of *qnr*-harbouring IncX plasmids and their transferability within different hosts under induced stress. *BMC Microbiology* 2022; **22**(1):136. doi: 10.1186/s12866-022-02546-6.
- Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA and Walsh TR.** How to detect NDM-1 producers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; **49**(2):718-21. doi: 10.1128/JCM.01773-10.
- Norizuki C, Wachino JI, Suzuki M, Kawamura K, Nagano N, Kimura K and Arakawa Y.** Specific *bla*_{CTX-M-8}/IncI1 Plasmid Transfer among Genetically Diverse *Escherichia coli* Isolates between Humans and Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017; **61**(6):e00663-17. doi: 10.1128/AAC.00663-17.
- Norman A, Hansen LH and Sørensen SJ.** Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 2009; **364**(1527):2275-89. doi: 10.1098/rstb.2009.0037.
- Norman A, Hansen LH, She Q and Sørensen SJ.** Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 2008; **60**(1):59-74. doi: 10.1016/j.plasmid.2008.03.003.

- Novick RP, Clowes RC, Cohen SN, Curtiss R 3rd, Datta N and Falkow S.** Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriological Reviews* 1976; **40**(1):168-89. doi: 10.1128/br.40.1.168-189.1976.
- Nuñez JK, Bai L, Harrington LB, Hinder TL and Doudna JA.** CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Molecular Cell* 2016; **62**(6):824-833. doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.027.
- Oladeinde A, Abdo Z, Press MO, Cook K, Cox NA, Zwirzitz B, Woyda R, Lakin SM, Thomas JC 4th, Looft T, Cosby DE, Hinton A Jr, Guard J, Line E, Rothrock MJ, Berrang ME, Herrington K, Zock G, Plumblee Lawrence J, Cudnik D, House S, Ingram K, Lariscy L, Wagner M, Aggrey SE, Chai L and Ritz C.** Horizontal Gene Transfer Is the Main Driver of Antimicrobial Resistance in Broiler Chicks Infected with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *mSystems* 2021; **6**(4):e0072921. doi: 10.1128/mSystems.00729-21.
- Olafson PU, Lohmeyer KH, Edrington TS and Loneragan GH.** Survival and fate of *Salmonella enterica* serovar Montevideo in adult horn flies (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 2014; **51**: 993-1001. doi: 10.1603/me13217.
- Oliveira PH, Touchon M and Rocha EP.** Regulation of genetic flux between bacteria by restriction-modification systems. *Proceedures of the National Academy of Sciences USA* 2016; **113**(20):5658-63. doi: 10.1073/pnas.1603257113.
- Oliveira PH, Touchon M and Rocha EP.** The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(16):10618-31. doi: 10.1093/nar/gku734.
- Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, Doumith M, Ellington MJ, Peto T, Crook D, Woodford N, Walker AS, Phan H and Sheppard AE.** Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Frontiers in Microbiology* 2017; **8**:182. doi: 10.3389/fmicb.2017.00182.
- Orman BE, Piñeiro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli DO and Centrón D.** Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; **46**(12):3963-70. doi: 10.1128/AAC.46.12.3963-3970.2002.
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA and Parkhill J.** Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 2015; **31**(22):3691-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Pallecchi L, Riccobono E, Sennati S, Mantella A, Bartalesi F, Trigosso C, Gotuzzo E, Bartoloni A and Rossolini GM.** Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the *qnrB19* gene in commensal enterobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**(2):678-82. doi: 10.1128/AAC.01160-09.
- Palmeira JD, Haenni M, Metayer V, Madec JY and Ferreira HMN.** Epidemic spread of Inc11/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) *bla*_{CTX-M-8} gene in *Escherichia coli* of Brazilian cattle. *Veterinary Microbiology* 2020; **243**:108629. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108629.
- Pan S, Liu S, Tai S, Yu J, Yuan E and Duan Y.** Genomic Analysis of an *Escherichia coli* Sequence Type 167 Isolate Harboring a Multidrug-Resistant Conjugative Plasmid, Suggesting the Potential Transmission of the Type Strains from Animals to Humans. *Infection and Drug Resistance* 2023; **16**:5077-5084. doi: 10.2147/IDR.S420635.
- Papa-Ezdra R, Caiata L, Palacio R, Outeda M, Cabezas L, Bálsamo A, Vignoli R, Bado I and Seija V.** Prevalence and molecular characterisation of carbapenemase-producing

Enterobacterales in an outbreak-free setting in a single hospital in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2021; **24**: 58.62. doi: 10.1016/j.jgar.2020.11.006.

Papa-Ezdra R, Cordeiro NF, Di Pilato V, Chiarelli A, Pallecchi L, Garcia-Fulgueiras V and Vignoli R. Description of novel resistance islands harbouring *bla*_{CTX-M-2} in IncC type 2 plasmids. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2021; **26**:37-41. doi: 10.1016/j.jgar.2021.03.031.

Papa-Ezdra R, Cordeiro NF, Ferreira F, García-Fulgueiras V, Araújo L, Mota MI, Outeda M, Seija V, Vignoli R and Bado I. First Detection of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates Due to 16S rRNA Methyltransferases with and Without *bla*_{NDM} in Uruguay. *Antibiotics (Basel)*. 2024; **13**(11):1029. doi: 10.3390/antibiotics13111029.

Parker JK, and Davies BW. Microcins reveal natural mechanisms of bacterial manipulation to inform therapeutic development. *Microbiology (Reading)*. 2022; **168**(4):001175. doi: 10.1099/mic.0.001175.

Partridge SR and Hall RM. The IS1111 family members IS4321 and IS5075 have subterminal inverted repeats and target the terminal inverted repeats of Tn21 family transposons. *Journal of Bacteriology* 2003; **185**(21):6371-84. doi: 10.1128/JB.185.21.6371-6384.2003.

Partridge SR, Kwong SM, Firth N and Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2018; **31**(4):e00088-17. doi: 10.1128/CMR.00088-17.

Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2011; **35**(5):820-55. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.

Pehlivanoglu F, Turutoglu H and Ozturk D. CTX-M-15-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* as Causative Agent of Bovine Mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease* 2016; **13**(9):477-82. doi: 10.1089/fpd.2015.2114.

Pellow D, Mizrahi I and Shamir R. PlasClass improves plasmid sequence classification. *PLoS Computational Biology*. 2020; **16**(4):e1007781. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007781.

Pereira JG, Soares VM, Tadielo LE, Ramires T and da Silva WP. Antimicrobial Resistance Profile of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* Isolated from Products Marketed on the Border of Brazil with Argentina and Uruguay. *Journal of Food Protection*. 2020; **83**(11):1941-1946. doi: 10.4315/JFP-20-176.

Philippon AM, Paul GC and Jacoby GA. New plasmid-mediated oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1986; **17**(4):415-22. doi: 10.1093/jac/17.4.415.

Picker MA and Wing HJ. H-NS, Its Family Members and Their Regulation of Virulence Genes in *Shigella* Species. *Genes (Basel)* 2016; **7**(12):112. doi: 10.3390/genes7120112.

Pitti M, Garcia-Vozmediano A, Tramuta C, CeRTiS Clinical Laboratories Group, Maurella C and Decastelli L. Monitoring of Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serotypes Isolated from Humans in Northwest Italy, 2012-2021. *Pathogens* 2023; **12**(1):89. doi: 10.3390/pathogens12010089.

Pizzolato-Cezar LR, Spira B and Machini MT. Bacterial toxin-antitoxin systems: Novel insights on toxin activation across populations and experimental shortcomings. *Current Research in Microbial Sciences* 2023; **5**:100204. doi: 10.1016/j.crmicr.2023.100204.

Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P and Schwarz S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum* 2018; **6**(4):10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017.

- Poirel L, Naas T and Nordmann P.** Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; **54**(1):24-38. doi: 10.1128/AAC.01512-08.
- Poirel L, Naas T, Le Thomas I, Karim A, Bingen E and Nordmann P.** CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; **45**(12):3355-61. doi: 10.1128/AAC.45.12.3355-3361.2001
- Pong CH, Moran RA and Hall RM.** Evolution of IS26-bounded pseudo-compound transposons carrying the *tet(C)* tetracycline resistance determinant. *Plasmid* 2020; **112**:102541. doi: 10.1016/j.plasmid.2020.102541.
- Porwollik S and McClelland M.** Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes and Infection* 2003 ;**5**(11):977-89. doi: 10.1016/s1286-4579(03)00186-2.
- Price MN, Dehal PS and Arkin AP.** FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution* 2009; **26**(7):1641-50. doi: 10.1093/molbev/msp077.
- Puangseeree J, Prathan R, Srisanga S, Chuanchuen R.** Molecular basis of the persistence of chloramphenicol resistance among *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from pigs, pork and humans in Thailand. *Public Library of Sciences (PLoS) One* 2024; **19**(5):e0304250. doi: 10.1371/journal.pone.0304250.
- Qiu J, Zhai Y, Wei M, Zheng C and Jiao X.** Toxin-antitoxin systems: Classification, biological roles, and applications. *Microbiological Research* 2022; **264**:127159. doi: 10.1016/j.micres.2022.127159.
- Quiñones B, Lee BG, Avilés Noriega A and Gorski L.** Plasmidome of *Salmonella enterica* serovar Infantis recovered from surface waters in a major agricultural region for leafy greens in California. *Public Library of Sciences (PLoS) One* 2024; **19**(12):e0316466. doi: 10.1371/journal.pone.0316466.
- Ramirez MS and Tolmasky ME.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates* 2010; **13**(6):151-71. doi: 10.1016/j.drug.2010.08.003.
- Rao DN, Dryden DT and Bheemanaik S.** Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(1):45-55. doi: 10.1093/nar/gkt616.
- Rau RB, de Lima-Morales D, Wink PL, Ribeiro AR and Barth AL.** *Salmonella enterica mcr-1* Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. *Foodborne Pathogens and Disease* 2020; **17**(3):202-208. doi: 10.1089/fpd.2019.2700.
- Rehman MA, Yin X, Persaud-Lachhman MG and Diarra MS.** First Detection of a Fosfomycin Resistance Gene, *fosA7*, in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017; **61**(8):e00410-17. doi: 10.1128/AAC.00410-17.
- Rice PA.** Serine Resolvases. *Microbiology Spectrum* 2015; **3**(2):MDNA3-0045-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0045-2014.
- Richard E, Darracq B, Loot C and Mazel D.** Unbridled Integrons: A Matter of Host Factors. *Cells* 2022; **11**(6):925. doi: 10.3390/cells11060925.
- Robertson J, Schonfeld J, Bessonov K, Bastedo P and Nash JHE.** A global survey of *Salmonella* plasmids and their associations with antimicrobial resistance. *Microbial Genomics* 2023; **9**(5):mgen001002. doi: 10.1099/mgen.0.001002.

- Rocha EPC, and Bikard D.** Microbial defenses against mobile genetic elements and viruses: Who defends whom from what? *PLoS Biology*. 2022; **20**(1):e3001514. doi: 10.1371/journal.pbio.3001514.
- Rocker A and Meinhart A.** Type II toxin: antitoxin systems. More than small selfish entities? *Current Genetics* 2016; **62**(2):287-90. doi: 10.1007/s00294-015-0541-7.
- Rodríguez-Beltrán J, DelaFuente J, León-Sampedro R, MacLean RC and San Millán Á.** Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 2021; **19**(6):347-359. doi: 10.1038/s41579-020-00497-1.
- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L and Pascual A.** Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resistance Updates* 2016; **29**:13-29. doi: 10.1016/j.drug.2016.09.001.
- Równicki M, Lasek R, Trylska J, Bartosik D and Targeting** Type II Toxin-Antitoxin Systems as Antibacterial Strategies. *Toxins (Basel)* 2020; **12**(9):568. doi: 10.3390/toxins12090568.
- Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, Mevius DJ and Hordijk J.** Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018; **73**(5):1121-1137. doi: 10.1093/jac/dkx488.
- Ryan MP, Armshaw P and Pembroke JT.** SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements (ICEs) Encode a Novel 'Trap-Door' Strategy for Mobile Element Escape. *Frontiers in Microbiology* 2016; **7**:829. doi: 10.3389/fmicb.2016.00829.
- Saga T, Sabtcheva S, Mitsutake K, Ishii Y, Tateda K, Yamaguchi K and Kaku M.** Characterization of *qnrB*-like genes in *Citrobacter* species of the American Type Culture Collection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013; **57**(6):2863-6. doi: 10.1128/AAC.02396-12.
- Sather LM, Zamani M, Muhammed Z, Kearsley JVS, Fisher GT, Jones KM, and Finan TM.** A broadly distributed predicted helicase/nuclease confers phage resistance via abortive infection. *Cell Host and Microbe* 2023; **31**(3):343-355.e5. doi: 10.1016/j.chom.2023.01.010.
- Saitou N and Nei M.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; **4**(4):406-25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sampei G, Furuya N, Tachibana K, Saitou Y, Suzuki T, Mizobuchi K and Komano T.** Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64. *Plasmid*. 2010; **64**(2):92-103. doi: 10.1016/j.plasmid.2010.05.005.
- Sampson TR and Weiss DS.** Exploiting CRISPR/Cas systems for biotechnology. *BioEssays* 2014; **36**(1):34-8. doi: 10.1002/bies.201300135.
- San Millan A, Heilbron K and MacLean RC.** Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *The ISME Journal* 2014; **8**(3):601-612. doi: 10.1038/ismej.2013.182.
- Schultz E, Barraud O, Madec JY, Haenni M, Cloeckert A, Ploy MC and Doublet B.** Multidrug Resistance *Salmonella* Genomic Island 1 in a *Morganella morganii* subsp. *morganii* Human Clinical Isolate from France. *mSphere*. 2017; **2**(2):e00118-17. doi: 10.1128/mSphere.00118-17.
- Seemann T.** Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; **30**(14):2068-9. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

- Sekizuka T, Inamine Y, Segawa T and Kuroda M.** Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 isolated from the effluent of a wastewater treatment plant in Tokyo Bay. *Infection and Drug Resistance*. 2019; **12**:2243-2249. doi: 10.2147/IDR.S215273.
- Sellera FP, Fuga B, Fontana H, Esposito F, Cardoso B, Konno S, Berl C, Cappellanes MH, Cortez M, Ikeda M, de Souza CM, Cerdeira L and Lincopan N.** Detection of IncN-pST15 one-health plasmid harbouring bla_{KPC-2} in a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated from an infected dog, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases* 2021; **68**(6):3083-3088. doi: 10.1111/tbed.14006.
- Sha Q, Forstner MRJ and Hahn D.** Diversity of *Salmonella* in biofilms and water in a headwater ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 2013; **83**: 642-649. doi: 10.1111/1574-6941.12021.
- Shane AL, Mody RK, Crump JA, Tarr PI, Steiner TS, Kotloff K, Langley JM, Wanke C, Warren CA, Cheng AC, Cantey J and Pickering LK.** 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 2017; **65**(12):e45-e80. doi: 10.1093/cid/cix669.
- Shariat N, Sandt CH, DiMarzio MJ, Barrangou R and Dudley EG.** CRISPR-MVLST subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Heidelberg and application in identifying outbreak isolates. *BMC Microbiology* 2013; **13**:254. doi: 10.1186/1471-2180-13-254.
- Shariat N, Timme RE, Pettengill JB, Barrangou R and Dudley EG.** Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology (Reading)* 2015; **161**(2):374-386. doi: 10.1099/mic.0.000005.
- Shaw LP, Rocha EPC and MacLean RC.** Restriction-modification systems have shaped the evolution and distribution of plasmids across bacteria. *Nucleic Acids Research* 2023; **51**(13):6806-6818. doi: 10.1093/nar/gkad452.
- Sia CM, Pearson JS, Howden BP, Williamson DA, Ingle DJ.** *Salmonella* pathogenicity islands in the genomic era. *Trends in Microbiology* 2025; **S0966-842X**(25)00038-1. doi: 10.1016/j.tim.2025.02.007.
- Siguier P, Gourgouyere E and Chandler M.** Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews* 2014; **38**(5):865-91. doi: 10.1111/1574-6976.12067.
- Siguier P, Gourgouyere E, Varani A, Ton-Hoang B and Chandler M.** Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiology Spectrum* 2015; **3**(2):MDNA3-0030-2014. doi: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014.
- Singh G, Yadav M, Ghosh C and Rathore JS.** Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences* 2021; **2**:100047. doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100047.
- Sjölund-Karlsson M, Howie R, Krueger A, Rickert R, Pecic G, Lupoli K, Folster JP and Whichard JM.** CTX-M-producing non-Typhi *Salmonella* spp. isolated from humans, United States. *Emerging Infectious Disease* 2011; **17**(1):97-9. doi: 10.3201/eid1701.100511.
- Slipski CJ, Jamieson-Datzkiw TR, Zhanel GG and Bay DC.** Characterization of Proteobacterial Plasmid Integron-Encoded *qac* Efflux Pump Sequence Diversity and Quaternary Ammonium Compound Antiseptic Selection in *Escherichia coli* Grown Planktonically and as Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2021; **65**(10):e0106921. doi: 10.1128/AAC.01069-21.

- Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP and de la Cruz F.** Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; **74**(3):434-52. doi: 10.1128/MMBR.00020-10.
- Smith H, Bossers A, Harders F, Wu G, Woodford N, Schwarz S, Guerra B, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Brouwer M and Mevius D.** Characterization of epidemic Inc11-ly plasmids harboring ambler class A and C genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from animals and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015; **59**(9):5357-65. doi: 10.1128/AAC.05006-14.
- Song W, Kim J, Bae IK, Jeong SH, Seo YH, Shin JH, Jang SJ, Uh Y, Shin JH, Lee MK and Lee K.** Chromosome-encoded AmpC and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Proteus mirabilis* from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011; **55**(4):1414-9. doi: 10.1128/AAC.01835-09.
- Srivastava A, Pati S, Kaushik H, Singh S and Garg LC.** Toxin-antitoxin systems and their medical applications: current status and future perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2021; **105**(5):1803-1821. doi: 10.1007/s00253-021-11134-z.
- Suez J, Porwollik S, Dagan A, Marzel A, Schorr YI, Desai PT, Agmon V, McClelland M, Rahav G and Gal-Mor O.** Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal *Salmonella* accounted for invasive disease in humans. *PLoS One* 2013; **8**(3):e58449. doi: 10.1371/journal.pone.0058449.
- Sullivan MJ, Petty NK and Beatson SA.** Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011; **27**(7):1009-10. doi: 10.1093/bioinformatics/btr039.
- Sun J, Yang RS, Zhang Q, Feng Y, Fang LX, Xia J, Li L, Lv XY, Duan JH, Liao XP, and Liu YH.** Co-transfer of bla_{NDM-5} and mcr-1 by an IncX3-X4 hybrid plasmid in *Escherichia coli*. *Nature Microbiology* 2016; **1**:16176. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.176.
- Takahashi H, Shao M, Furuya N and Komano T.** The genome sequence of the incompatibility group Iy plasmid R621a: evolution of IncI plasmids. *Plasmid*. 2011; **66**(2):112-21. doi: 10.1016/j.plasmid.2011.06.004.
- Tamura K, Nei M and Kumar S.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2004; **101**(30):11030-5. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
- Tange O.** GNU Parallel the command-line power tool. ;Login: The USENIX Magazine 2011 **36**(1):42-47.
- Tanner JR and Kingsley RA.** Evolution of *Salmonella* within Hosts. *Trends in Microbiology* 2018; **26**(12):986-998. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.001.
- Tavares RDS, Tacão M and Henriques I.** Integrons are key players in the spread of beta-lactamase-encoding genes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2025; **65**(3):107421. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2024.107421.
- Tesson F, Hervé A, Mordret E, Touchon M, d'Humières C, Cury J, and Bernheim A.** Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nature Communications* 2022; **13**(1):2561. doi: 10.1038/s41467-022-30269-9.
- Toleman MA, Bennett PM and Walsh TR.** ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2006; **70**(2):296-316. doi: 10.1128/MMBR.00048-05.
- Tolmasky ME and Crosa JH.** Genetic organization of antibiotic resistance genes (*aac(6')*-Ib, *aadA*, and *oxa9*) in the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid*. 1993; **29**(1):31-40. doi: 10.1006/plas.1993.1004.

Troxell B. A type 6 secretion system (T6SS) encoded gene within *Salmonella enterica* serovar Enteritidis contributes to virulence. *Virulence* 2018; **9**(1):585-587. doi: 10.1080/21505594.2017.1421829.

Unterholzner SJ, Poppenberger B and Rozhon W. Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements* 2013; **3**(5):e26219. doi: 10.4161/mge.26219.

Valcek A, Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, Korsgaard HB, Seyfarth AM, Hendriksen RS, Hasman H and Hammerum AM. IncI1 ST3 and IncI1 ST7 plasmids from CTX-M-1-producing *Escherichia coli* obtained from patients with bloodstream infections are closely related to plasmids from *E. coli* of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2019; **74**(8):2171-2175. doi: 10.1093/jac/dkz199.

van Asten AJ and van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2005; **44**(3):251-9. doi: 10.1016/j.femsim.2005.02.002.

van Duijkeren E, Schink AK, Roberts MC, Wang Y and Schwarz S. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbiology Spectrum* 2017; **6**(2):ARBA-0019-2017. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017.

van Erp PB, Jackson RN, Carter J, Golden SM, Bailey S and Wiedenheft B. Mechanism of CRISPR-RNA guided recognition of DNA targets in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 2015; **43**(17):8381-91. doi: 10.1093/nar/gkv793.

van Leeuwen WJ, van Embden J, Guinée P, Kampelmacher EH, Manten A, van Schothorst M, and Voogd CE. Decrease of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979; **16**(2):237-9. doi: 10.1128/AAC.16.2.237.

Vandecraen J, Chandler M, Aertsen A and Van Houdt R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical Reviews in Microbiology* 2017; **43**(6):709-730. doi: 10.1080/1040841X.2017.1303661.

Vaser R and Šikić M. Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nature Computational Science*. 2021; **1**(5):332-336. doi: 10.1038/s43588-021-00073-4.

Vasu K and Nagaraja V. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2013; **77**(1):53-72. doi: 10.1128/MMBR.00044-12.

Vázquez X, Fernández J, Heinisch JJ, Rodicio R and Rodicio MR. Insights into the Evolution of IncR Plasmids Found in the Southern European Clone of the Monophasic Variant of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Antibiotics (Basel)*. 2024; **13**(4):314. doi: 10.3390/antibiotics13040314.

Vázquez X, Fernández J, Hernáez S, Rodicio R and Rodicio MR. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) in Two Clinical Strains of *Salmonella enterica* Serovar Corvallis. *Microorganisms* 2022; **10**(3):579. doi: 10.3390/microorganisms10030579.

Velasquez-Munoz A, Castro-Vargas R, Cullens-Nobis FM, Mani R and Abuelo A. Review: *Salmonella* Dublín in dairy cattle. *Frontiers in Veterinary Science* 2024; **10**:1331767. doi: 10.3389/fvets.2023.1331767.

Vignoli R, Cordeiro NF, García V, Mota MI, Betancor L, Power P, Chabalgoity JA, Schelotto F, Gutkind G and Ayala JA. New TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar derby isolates from Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; **50**(2):781-4. doi: 10.1128/AAC.50.2.781-784.2006.

- Wang B, Mittermeier M and Artsimovitch I.** RfaH May Oppose Silencing by H-NS and YmoA Proteins during Transcription Elongation. *Journal of Bacteriology* 2022; **204**(4):e0059921. doi: 10.1128/jb.00599-21.
- Wang H, Cheng H, Huang B, Hu X, Chen Y, Zheng L, Yang L, Deng J and Wang Q.** Characterization of resistance genes and plasmids from sick children caused by *Salmonella enterica* resistance to azithromycin in Shenzhen, China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2023; **13**:1116172. doi: 10.3389/fcimb.2023.1116172.
- Wang J, Jiang Y, Mei CY, Wang ZY, Zhong FG, Zhang XX, Lv LC, Lu MJ, Wu H and Jiao X.** Characterization of an Extensively Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Indiana Strain Harboring Chromosomal bla_{NDM-9} in China. *Infection and Drug Resistance* 2022; **15**:2015-2019. doi: 10.2147/IDR.S364115.
- Wang J, Li Q, Jiang Y, Wang Z and Jiao X.** *fosA7*: a silent fosfomycin resistance gene in *Salmonella*? *Lancet Microbe*. 2024; **5**(3):e211. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00342-7.
- Wang J, Wang Y, Wang ZY, Wu H, Mei CY, Shen PC, Pan ZM and Jiao X.** Chromosomally Located *fosA7* in *Salmonella* Isolates From China. *Frontiers in Microbiology* 2021; **12**:781306. doi: 10.3389/fmicb.2021.781306.
- Wang M, Qazi IH, Wang L, Zhou G, and Han H.** *Salmonella* Virulence and Immune Escape. *Microorganisms* 2020; **8**(3):407. doi: 10.3390/microorganisms8030407.
- Wang X, Kong N, Cao M, Zhang L, Sun M, Xiao L, Li G and Wei Q.** Comparison of Class 2 Integron Integrase Activities. *Current Microbiology* 2021; **78**(3):967-978. doi: 10.1007/s00284-021-02352-9.
- Wang X, Lord DM, Cheng HY, Osbourne DO, Hong SH, Sanchez-Torres V, Quiroga C, Zheng K, Herrmann T, Peti W, Benedik MJ, Page R and Wood TK.** A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nature Chemical Biology* 2012; **8**(10):855-61. doi: 10.1038/nchembio.1062.
- Wang X, Zhao J, Ji F, Chang H, Qin J, Zhang C, Hu G, Zhu J, Yang J, Jia Z, Li G, Qin J, Wu B and Wang C.** Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. *Frontiers in Microbiology* 2021; **12**:754931. doi: 10.3389/fmicb.2021.754931.
- Wein T, Wang Y, Hülter NF, Hammerschmidt K, and Dagan T.** Antibiotics Interfere with the Evolution of Plasmid Stability. *Current Biology* 2020; **30**(19):3841-3847.e4. doi: 10.1016/j.cub.2020.07.019.
- WHO bacterial priority pathogens list, 2024:** Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1>.
- WHO Critically important antimicrobials for human medicine: 6th revision.** <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?sequence=1>
- Wick RR and Holt KE.** Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies. *PLoS Computational Biology* 2022; **18**(1):e1009802. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009802.
- Wick RR, Judd LM, Cerdeira LT, Hawkey J, Méric G, Vezina B, Wyres KL and Holt KE.** Tricycler: consensus long-read assemblies for bacterial genomes. *Genome Biology*. 2021. **22**(1):266. doi: 10.1186/s13059-021-02483-z.

- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL and Holt KE.** Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology* 2017; **13**(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- Wong MH, Chan EW, Xie L, Li R and Chen S.** IncHI2 Plasmids Are the Key Vectors Responsible for *oqxAB* Transmission among *Salmonella* Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016; **60**(11):6911-6915. doi: 10.1128/AAC.01555-16.
- Wozniak RA and Waldor MK.** Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews, Microbiology* 2010; **8**(8):552-63. doi: 10.1038/nrmicro2382.
- Wozniak RA, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, Déry C, Burrus V and Waldor MK.** Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *Public Library of Sciences (PLoS) Genetics* 2009; **5**(12):e1000786. doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.
- Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A and Zong Z.** NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews* 2019; **32**(2):e00115-18. doi: 10.1128/CMR.00115-18.
- Xie M, Chen K, Chan EW and Chen S.** Identification and genetic characterization of two conjugative plasmids that confer azithromycin resistance in *Salmonella*. *Emerging Microbes and Infections* 2022; **11**(1):1049-1057. doi: 10.1080/22221751.2022.2058420.
- Xu C, Rao J, Xie Y, Lu J, Li Z, Dong C, Wang L, Jiang J, Chen C, and Chen S.** The DNA Phosphorothioation Restriction-Modification System Influences the Antimicrobial Resistance of Pathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum* 2023; **11**(1):e0350922. doi: 10.1128/spectrum.03509-22.
- Xue C, and Sashital DG.** Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus*. 2019; **8**(2):10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018.
- Yau S, Liu X, Djordjevic SP and Hall RM.** RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their *sul2-strA-strB* antibiotic resistance gene cluster. *Microbial Drug Resistance* 2010; **16**(4):249-52. doi: 10.1089/mdr.2010.0033.
- Yoon EJ and Jeong SH.** Class D β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2021; **76**(4):836-864. doi: 10.1093/jac/dkaa513.
- Yoshida T, Kim SR and Komano T.** Twelve pil genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus. *Journal of Bacteriology* 1999; **181**(7):2038-43. doi: 10.1128/JB.181.7.2038-2043.1999.
- Yu K, Huang Z, Xiao Y, Gao H, Bai X and Wang D.** Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis. *Drug Resistance Updates* 2024; **73**:101036. doi: 10.1016/j.drug.2023.101036.
- Yu Z, Wang Q, Pinilla-Redondo R, Madsen JS, Clasen KAD, Ananbeh H, Olesen AK, Gong Z, Yang N, Dechesne A, Smets B, Nesme J and Sørensen SJ.** Horizontal transmission of a multidrug-resistant IncN plasmid isolated from urban wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2024; **271**:115971. doi: 10.1016/j.ecoenv.2024.115971.
- Yue M, Rankin SC, Blanchet RT, Nulton JD, Edwards RA, and Schifferli DM.** Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro- and microevolution. *PLoS One* 2012; **7**(6):e38596. doi: 10.1371/journal.pone.0038596.

Yue M and Schifferli M. Allelic variation in *Salmonella*: an underappreciated driver of adaptation and virulence. *Frontiers in Microbiology* 2014; **4**: 1-10. doi: 10.3389/fmicb.2013.00419.

Zakrzewska M and Burmistrz M. Mechanisms regulating the CRISPR-Cas systems. *Front Microbiol.* 2023 Feb 28;14:1060337. doi: 10.3389/fmicb.2023.1060337.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM and Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; **67**(11):2640-4. doi: 10.1093/jac/dks261.

Zhang J, Kumar S and Nei M. Small-sample tests of episodic adaptive evolution: a case study of primate lysozymes. *Molecular Biology and Evolution* 1997; **14**(12):1335-8. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025743.

Zhang S, den Bakker HC, Li S, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, Lauer AC, Fields PI and Deng X. SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Applied and Environmental Microbiology*. 2019; **85**(23):e01746-19. doi: 10.1128/AEM.01746-19.

Zhang Y, Lei CW, Chen X, Yao TG, Yu JW, Hu WL, Mao X, Wang HN. Characterization of IncC Plasmids in Enterobacterales of Food-Producing Animals Originating From China. *Frontiers in Microbiology* 2020; **11**:580960. doi: 10.3389/fmicb.2020.580960.

Zhang Y, Zhang J, Cai P, Lu Y, Sun RY, Cao MT, Xu XL, Webber MA and Jiang HX. IncHI1 plasmids are epidemic vectors that mediate transmission of *tet(X4)* in *Escherichia coli* isolated from China. *Frontiers in Microbiology* 2023; **14**:1153139. doi: 10.3389/fmicb.2023.1153139.

Zhang Z, Tian X and Shi C. Global Spread of MCR-Producing *Salmonella enterica* Isolates. *Antibiotics (Basel)*. 2022; **11**(8):998. doi: 10.3390/antibiotics11080998.

Cepa	Serovar	Año	Origen	MLST	Genes RAM	Grupos de Incompatibilidad
UY101	Agona	1976	Coprocultivo	ST13	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY102	Agona	1976	Coprocultivo	ST13	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1 Col(pHAD28)
UY032	Anatum	2007	Coprocultivo	ST64	<i>aac(6')-laa</i>	Incl1, IncFII(pECLA)
UY198	Cerro	2013	Coprocultivo	ST1593-like	<i>aac(6')-laa, bla_{SHV-2}</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
SCho10	Choleraesuis	2011	Desconocido	ST145	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
SCho8	Choleraesuis	1994	Hemocultivo	ST145	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY103	Derby	1983	Embutidos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	ColpVC, ColRNAI
UY104	Derby	1983	Embutidos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	Col(pHAD28), ColRNAI
UY105	Derby	1983	Embutidos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	ColpVC, ColRNAI
UY106	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	ColRNAI, pKPC-CAV1193
UY107	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, aac(6')-lb, ant(3'')-la, bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	pKPC-CAV1193
UY108	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	Incl1, FII(pECLA), ColRNAI, pKPC-CAV1193
UY109	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, aac(6')-lb, ant(3'')-la, bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	Incl1, FII(pECLA), ColRNAI, Col8282, pKPC-CAV1193
UY110	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, aac(6')-lb, ant(3'')-la, bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	Incl1, FII(pECLA), ColRNAI, Col440II, pKPC-CAV1193
UY111	Derby	1984	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, aac(6')-lb, ant(3'')-la, bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1a}, fosA7</i>	Incl1, FII(pECLA), ColRNAI, ColpEC648, pKPC-CAV1193
UY112	Derby	1985	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	ColpVC, ColRNAI
UY113	Derby	1990	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	Incl1, IncFII(pECLA)
UY114	Derby	1992	Embutidos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	IncFII(Cf), IncFII(p96A), Col(pHAD28)
UY115	Derby	1991	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	Col(pHAD28)
UY116	Derby	2008	Hemocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, aadA2, fosA7, sul1, tet(A), qacEΔ1</i>	IncQ2, ColpEC648, Col(MGD2), Col(Ye4449)
UY117	Derby	2009	Coprocultivo	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY118	Derby	2001	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY119	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY120	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY121	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY122	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY123	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY124	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY125	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY126	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	ColpVC, ColRNAI, Col(BS512)
UY127	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY128	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	Col8282
UY129	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
UY130	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	Col(pHAD28), Col440II
UY132	Derby	2002	Huevos	ST40	<i>aac(6')-laa, fosA7</i>	-
ERR036125	Dublín	1995	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036126	Dublín	2004	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036127	Dublín	2006	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036128	Dublín	2008	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036129	Dublín	2000	Coprocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036130	Dublín	2005	Coprocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036131	Dublín	2008	Coprocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY183	Dublín	2011	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-1a}</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY184	Dublín	2011	Hemocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY185	Dublín	2011	Urocultivo	ST10	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncQ1, ColpVC, Col(BS512)
UY186	Dublín	1996	Bovino	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY187	Dublín	1996	Bovino	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY188	Dublín	2004	Bovino	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
UY189	Dublín	2004	Bovino	ST10	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1
ERR036132	Enteritidis	1988	Coprocultivo	ST1974	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
ERR036134	Enteritidis	1989	Coprocultivo	ST1974	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
ERR036135	Enteritidis	1994	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

ERR036136	Enteritidis	1999	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	-
ERR036137	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
ERR036138	Enteritidis	2002	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
ERR036139	Enteritidis	2002	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	-
ERR036140	Enteritidis	2005	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), ColRNAI
UY001	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY002	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY003	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY004	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY005	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY006	Enteritidis	2001	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY007	Enteritidis	2002	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY008	Enteritidis	1994	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY009	Enteritidis	1994	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY010	Enteritidis	1994	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY011	Enteritidis	1995	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY012	Enteritidis	1995	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY013	Enteritidis	1995	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY014	Enteritidis	1998	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY015	Enteritidis	1998	Osteomielitis	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY016	Enteritidis	1999	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY017	Enteritidis	1999	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	
UY018	Enteritidis	1999	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY019	Enteritidis	2000	Pollo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY020	Enteritidis	2000	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY021	Enteritidis	2002	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY022	Enteritidis	2002	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	
UY023	Enteritidis	2003	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY024	Enteritidis	2004	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY025	Enteritidis	2005	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY026	Enteritidis	2005	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY027	Enteritidis	2006	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY028	Enteritidis	2008	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY029	Enteritidis	2009	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY030	Enteritidis	2009	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY031	Enteritidis	2007	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, ColEC648
UY033	Enteritidis	2007	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY034	Enteritidis	2007	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY035	Enteritidis	2007	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY036	Enteritidis	2009	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY037	Enteritidis	2009	Desconocido	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY038	Enteritidis	2009	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY039	Enteritidis	2009	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY040	Enteritidis	2009	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY041	Enteritidis	2010	Pollo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY043	Enteritidis	2011	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY044	Enteritidis	2011	Alimentos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY045	Enteritidis	2010	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY046	Enteritidis	2010	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY047	Enteritidis	2010	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY048	Enteritidis	2013	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY049	Enteritidis	2013	Hemocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY050	Enteritidis	2011	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa, bla_{CTX-M14}, bla_{TEM-1b}, ermB</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)
UY070	Enteritidis	1993	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY140	Enteritidis	2000	Huevos	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY144	Enteritidis	2004	Coprocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY172	Enteritidis	2002	Pollo	ST11	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-1b}, qnrB19</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA), IncX1, Col(pHAD28), Col440II, ColpEC648

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY174	Enteritidis	2009	Pollo	ST11	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY191	Enteritidis	ND	Perro	ST11	<i>aac(6')-laa, aph(6)-ld, dfrA14, sul2, tet(B)</i>	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncFII(pRSB107), IncQ1
UY193	Enteritidis	2022	Urocultivo	ST11	<i>aac(6')-laa, aadA2, aph(3')-la, bla_{NDM-1}, catA1, cmlA1, dfrA12, mph(A), qnrA1, sul1, sul2, qacEΔ1</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncF(pAR0022), IncC, Col(MGD2), Col(Ye4449)
UY154	Gallinarum	2000	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa, tet(B)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncFIA(HI1), Col(pHAD28)
UY155	Gallinarum	2000	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa, tet(B)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncFIA(HI1), Col(pHAD28)
UY156	Gallinarum	2001	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR022)
UY157	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY158	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY159	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY160	Gallinarum	2001	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa, tet(B)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncFIA(HI1)
UY161	Gallinarum	2001	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa, tet(B)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncFIA(HI1)
UY162	Gallinarum	2001	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa, tet(B)</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncHI1A, IncHI1B(R27), IncFIA(HI1)
UY163	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY164	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY165	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY166	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY167	Gallinarum	2001	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR022)
UY168	Gallinarum	2002	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY169	Gallinarum	2002	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY170	Gallinarum	2002	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY171	Gallinarum	2002	Huevos	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	Col(pHAD28)
UY173	Gallinarum	2002	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	-

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY176	Gallinarum	2012	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), Col(pHAD28)
UY177	Gallinarum	2012	Pollo	ST78	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(S), IncFII(pAR0022), Col(pHAD28)
UY180	Give	2001	Hemocultivo	ST654	<i>aac(6')-laa</i>	Col(BS512)
UY181	Give	2002	Harinas	ST654	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY081	Hadar	1998	Coprocultivo	ST33	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bleO, tet(A)</i>	IncX1, IncX3, ColpVC, Col(BS512)
UY085	Heidelberg	2000	Pollo	ST15	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-1b}, fosA7</i>	Incl1, IncFII(pECLA), IncX1, ColRNAI, Col440II
UY137	Livingstone	1997	Pollo	ST638	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY133	Montevideo	1978	Agua residual	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY134	Montevideo	1999	Alimentos	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY135	Montevideo	1983	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY138	Montevideo	1997	Harinas	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY139	Montevideo	1998	Hemocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY143	Montevideo	2003	Bovino	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY145	Montevideo	2004	Pollo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY147	Montevideo	2007	Hemocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa, bleO</i>	IncX1, IncX3
UY148	Montevideo	2008	Hemocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY149	Montevideo	2008	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY150	Montevideo	1998	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY151	Montevideo	2005	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY152	Montevideo	2005	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY153	Montevideo	2005	Coprocultivo	ST138	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY141	Orianenburg	2001	Harinas	ST23	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY142	Orianenburg	2001	Harinas	ST23	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY178	Panamá	2002	Huevos	ST48	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-144}</i>	Col(pHAD28)
UY179	Panamá	2002	Huevos	ST48	<i>aac(6')-laa, bla_{TEM-144}</i>	Col(pHAD28)
UY182	Panamá	2004	Coprocultivo	ST48	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY136	Paratyphi_B	1997	Harinas	ST88	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY079	Seftenberg	1997	Coprocultivo	ST185	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY175	Seftenberg	2012	Pollo	ST14	<i>aac(6')-laa</i>	-

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY042	Typhimurium	2010	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, bla_{TEM-1b}, tet(A)</i>	IncFIA, IncFIB(AP001918), Col(pHAD28)
UY051	Typhimurium	1977	Hemocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia, bla_{TEM-1b}, tet(C)</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, Col(pHAD28), Col440II
UY052	Typhimurium	1978	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, ant(2'')-Ia, ant(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{OXA-4}, bla_{TEM-1b}, catA1, dfrA1, sul1, sul2, tet(C), qacEΔ1</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA), IncQ1, IncX1, IncFIA(HI1), ColpVC
UY053	Typhimurium	1978	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, ant(2'')-Ia, ant(3'')-Ia, bla_{OXA-4}, bla_{TEM-1b}, catA1, dfrA1, sul1, qacEΔ1</i>	IncX1, ColpVC
UY054	Typhimurium	1981	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, ant(2'')-Ia, ant(3'')-Ia, aph(3')-Ia, bla_{OXA-4}, bla_{TEM-1b}, catA1, dfrA1, sul1, tet(C), qacEΔ1</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncFIA(HI1), ColpVC
UY055	Typhimurium	1980	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY056	Typhimurium	1979	Hemocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncI1, IncFII(pECLA), ColpEC648, ColRNAI, Col440I, Col(pHAD28)
UY057	Typhimurium	1977	Ovino	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFII(pECLA), pESA2
UY058	Typhimurium	1978	Agua residual	ST2199	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)
UY059	Typhimurium	1979	Embutidos	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY060	Typhimurium	1983	Carnes	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)
UY061	Typhimurium	1987	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY062	Typhimurium	1987	Psitácido	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY063	Typhimurium	1988	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY064	Typhimurium	1989	Animal	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY065	Typhimurium	1989	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY066	Typhimurium	1990	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY068	Typhimurium	1992	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY069	Typhimurium	1992	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncX3

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY071	Typhimurium	1993	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, Col(pHAD28)
UY072	Typhimurium	1994	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)
UY073	Typhimurium	1994	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncX3
UY074	Typhimurium	1995	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), Col(pHAD28), Col440II
UY075	Typhimurium	1995	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY076	Typhimurium	1996	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncX3
UY077	Typhimurium	1996	Huevos	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncX3, ColpVC
UY078	Typhimurium	1996	Huevos	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncX1, IncX3
UY080	Typhimurium	1997	Huevos	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(C)</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncQ1, Col(pHAD28)
UY082	Typhimurium	1988	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY083	Typhimurium	1999	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY084	Typhimurium	1999	Menudos de pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY086	Typhimurium	2002	Huevos	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)
UY087	Typhimurium	2003	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY088	Typhimurium	2003	Bovino	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY089	Typhimurium	2007	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY090	Typhimurium	2009	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), Col(pHAD28)
UY091	Typhimurium	2008	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, oxqAB, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, qnrB19, tet(B)</i>	IncHI2A, IncHI2, pKPC-CAV1321, Col(pHAD28), Col440II
UY092	Typhimurium	2009	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, bla_{CMY-2}</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), IncI1, IncFII(pECLA)

Anexo: Principales Datos de Genomas Secuenciados

UY093	Typhimurium	2009	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, bla_{CMY-2}</i>	Incl1, IncFII(pECLA)
UY094	Typhimurium	2012	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, bla_{CTX-M-14}, bla_{TEM-1b}, dfrA25, ermB, qnrB2, sul1, tet(A), qacEΔ1</i>	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pEH01), Incl1, IncFII(pECLA), IncN, Col(pHAD28)
UY095	Typhimurium	2012	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-8}, bleO, floR, sul2, tet(A)</i>	Incl1, FII(pECLA), IncC, IncX1, IncX3, Col(pHAD28)
UY096	Typhimurium	2007	Pollo	ST19	<i>aac(6')-laa, aac(3)-VIa, ant(3'')-Ia, sul1, qacEΔ1</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), Incl1, IncFII(pECLA)
UY097	Typhimurium	2009	Alimentos	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), Col(pHAD28)
UY098	Typhimurium	2012	Bovino	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	-
UY099	Typhimurium	2011	Alimentos	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, sul2, tet(A)</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022), Incl1, IncX1, Col(pHAD28)
UY100	Typhimurium	2010	Menudos de pollo	ST19	<i>aac(6')-laa</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncFII(pAR0022)
UY190	Typhimurium	ND	Desconocido	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(6)-Id, dfrA14, sul2, tet(B)</i>	IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII(pAR0022), IncFII(pRSB107), IncQ1
UY192	Typhimurium	2016	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, arr-3, aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA16, ant(3'')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-15}, bla_{OXA-1}, bla_{TEM-1b}, catA1, catB3, dfrA27, qnrB1, sul1, sul2, tet(A), qacEΔ1</i>	IncHI2A, IncHI2, pKPC-CAV1321
UY194	Typhimurium	2012	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla_{CTX-M-8}, bleO, floR, sul2, tet(A)</i>	Incl1, IncFII(pECLA), IncC, IncX1, ColRNAI
UY195	Typhimurium	2012	Urocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, bla_{SHV-2}</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncF(pAR0022), Incl1, IncFII(pECLA), Col440II, ColRNAI
UY196	Typhimurium	2013	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, aac(3)-IIa, aph(3')-Ia, tet(A), bla_{CMY-2}, bla_{TEM-1b}</i>	IncFIA, IncFIB(AP001918), Incl1, IncFII(pECLA)
UY197	Typhimurium	2013	Coprocultivo	ST19	<i>aac(6')-laa, bla_{CMY-2}</i>	IncFIB(S), IncFII(S), IncF(pAR0022), Incl1, IncFII(pECLA)

Article

First Report in the Americas of *S. enterica* Var. Enteritidis Carrying *bla*_{NDM-1} in a Putatively New Sub-Lineage of IncC2 Plasmids

Nicolás F. Cordeiro ¹, Romina Papa-Ezdra ¹, Germán Traglia ², Inés Bado ¹, Virginia García-Fulgueiras ¹, María N. Cortinas ³, Leticia Caiata ³, Mariana López-Vega ³, Ana Otero ³, Martín López ⁴, Patricia Hitateguy ⁴, Cristina Mogdasy ³ and Rafael Vignoli ^{1,*}

¹ Unidad Académica de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Av. Alfredo Navarro 3051, Montevideo 11600, Uruguay; ncordeiro@higiene.edu.uy (N.F.C.); rpapa@higiene.edu.uy (R.P.-E.); ibado@higiene.edu.uy (I.B.); virginia@higiene.edu.uy (V.G.-F.)

² Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto 50000, Uruguay; gtraglia@higiene.edu.uy

³ Departamentos de Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública, Montevideo 11600, Uruguay; mncortinas@msp.gub.uy (M.N.C.); lcaiata@msp.gub.uy (L.C.); mlopez@msp.gub.uy (M.L.-V.); aotero@msp.gub.uy (A.O.); cmogdasy@medicauruguay.com.uy (C.M.)

⁴ Sanatorio Círculo Católico, Montevideo 11800, Uruguay; mlopez@circulocatolico.com.uy (M.L.); patricia.hitateguy@asse.com.uy (P.H.)

* Correspondence: rvignoli@higiene.edu.uy

Abstract: Background: Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales have steadily multiplied over time, becoming a major threat to healthcare systems due to limited therapeutic options and high case-fatality rates. Case report: We studied a patient who, after being discharged from an ICU, developed salmonellosis caused by an antibiotic-susceptible *S. enteritidis*. After undergoing treatment with ciprofloxacin, the patient presented an episode of asymptomatic bacteriuria originated by a carbapenem and ciprofloxacin-resistant *S. enteritidis*. Results: Whole genome sequencing analysis revealed that both *Salmonella* isolates belonged to the same strain, and that isolate SEn_T2 acquired a plasmid carrying both *bla*_{NDM-1} and *qnrA1* genes (pIncCSEn) which was previously present in the patient's gut in at least one *Enterobacter cloacae* isolate. Additionally, pIncCSEn was identified as a putatively new sub-lineage of IncC2 plasmids which lacked the first copy of the methyltransferase gene *dcm* and the *rhs* gene. The resistance genes *bla*_{NDM-1} and *qnrA1* were incorporated into a Tn21-derived transposon that included a complex class 1 integron whose genetic arrangement was: *intI1-dfrA12-orfF-aadA2-qacEΔ1-sul1-ISCR1-trpF-ble-bla*_{NDM-1} (in reverse direction)-*ISAbA125-ISCR1-qnrA-cmlA1-qacEΔ1-sul1*. Conclusions: Antimicrobial persistence and co-selection of antibiotic resistance play an important role in the dissemination of antimicrobial resistance genes; in this regard, a joint effort involving the infection control team, effective antibiotic stewardship, and genomic surveillance could help mitigate the spread of these multidrug resistant microorganisms.

Keywords: carbapenemases; antimicrobial resistance; NDM-1; *Salmonella enterica*; transposon



Academic Editors: José Alejandro Di Conza and Barbara Ghiglione

Received: 9 May 2025

Revised: 16 June 2025

Accepted: 17 June 2025

Published: 18 June 2025

Citation: Cordeiro, N.F.; Papa-Ezdra, R.; Traglia, G.; Bado, I.; García-Fulgueiras, V.; Cortinas, M.N.; Caiata, L.; López-Vega, M.; Otero, A.; López, M.; et al. First Report in the Americas of *S. enterica* Var. Enteritidis Carrying *bla*_{NDM-1} in a Putatively New Sub-Lineage of IncC2 Plasmids. *Antibiotics* **2025**, *14*, 620. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14060620>

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Human salmonellosis can be divided into three main diseases, typhoid fever, paratyphoid fever and non-typhoidal *Salmonella* (NTS) infections [1]. In the United States alone, NTS is responsible for 1.35 million cases, 26,500 hospitalizations, and 420 deaths, annually

(<https://www.cdc.gov/salmonella/>, accessed on 18 June 2024). Current guidelines indicate that only groups at increased risk for invasive NTS infections (e.g., neonates, elderly patients, persons with cardiac disease, and immunocompromised patients, etc.) should be treated [2]. Ceftriaxone, ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole or amoxicillin are the recommended primary treatment options for invasive salmonellosis [2]. Antimicrobial resistance in NTS is variable, and is related to factors such as serotype, source, and geographical location [3]. Accordingly, considering that the reservoir for most *Salmonella enterica* strains that cause human infections is the digestive tract of livestock, it is not surprising that the resistance profile and resistance genes present in this species resemble those detected in other enteric microorganisms present in livestock [3–5]. In this regard, transferable resistance to tetracycline, streptomycin, quinolones, and even oxyimino cephalosporins (mediated by ESBLs or plasmid-borne AmpC enzymes) is quite frequent [5,6].

Although carbapenems should not be administered to food-producing animals [7], in recent years the emergence of carbapenemase-producing *Salmonella enterica* isolates, especially metallo-carbapenemases, is a matter of concern [8]. Among the various types of transferable metallo- β -lactamases (MBLs), NDM enzymes stand out for showing a faster and wider range of dissemination [9]; so far, the presence of this MBL has been reported in over 90 countries, including Uruguay [10,11]. Although NDM alleles have been mainly reported in Enterobacterales isolates of clinical origin, other sources include the environment [12,13], wild animals, pets, livestock [14,15] as well as food [16,17].

Several genetic platforms have been associated with bla_{NDM} alleles. In Enterobacterales, these genes have been identified on plasmids belonging to at least 20 different incompatibility groups, with IncX3, IncFII, and IncC being the most common [10]. Among these, IncC plasmids-broad-host-range plasmids with sizes ranging approximately 68–330 kb- have been extensively studied for their role in mobilizing extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase genes, along with other resistance determinants [18,19]. Notably, the occurrence of bla_{NDM} alleles in IncC plasmids has been primarily associated with type 1a variants [20]. In our country, bla_{NDM-1} has been previously detected in various species within the *Enterobacteriaceae* and *Morganellaceae* families, predominantly carried by IncC plasmids [11,21].

The recent detection of a carbapenem-resistant *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. enteritidis*) harboring bla_{NDM-1} on a type 2 IncC2 plasmid, in Uruguay and possibly in the Americas, represents a significant public health concern. Accordingly, our objective was to analyze said isolate, and to gain some insight into the different factors underlying the plasmid mediated dissemination of bla_{NDM} genes across species.

2. Results

2.1. Case Report

A 78-year-old male with a history of hypertension, type-2 diabetes mellitus, ischemic heart disease, and a stroke episode in 2021, was admitted into a moderate-care setting with radiological and antigenic diagnosis of COVID-19 pneumonitis. On day 5, he was transferred to the ICU due to worsening dyspnea which required invasive mechanical ventilation. Routine rectal swabbing in search of carbapenemase-producing pathogens yielded an NDM-producing *E. cloacae* (hereinafter Eclo_NDM). Due to prolonged stay in the ICU, the patient developed a *K. pneumoniae*-induced purulent tracheobronchitis and received ceftriaxone for 7 days. Later, the subject also developed a catheter-related bloodstream infection due to *A. baumannii*, undergoing treatment with double-dose ampicillin-sulbactam for 7 days.

On day 35, the patient was transferred from the ICU into a moderate-care room, and on day 42 developed malaise, fever, and diarrhea. Bacteriological cultures both from blood

and stool samples yielded *Salmonella enterica* var. Enteritidis, isolate T1 (hereinafter SEn_T1). On day 45, antibiotic treatment with ciprofloxacin was initiated, lasting for 14 days. The patient was finally discharged on day 54.

Twenty-four days after discharge (day 82), the patient was readmitted to the Emergency Department with fever and malaise lasting 72 h. General assessment and paraclinical studies, including a bacteriological round, revealed an upper respiratory syndrome, with chest X-ray findings suggestive of acute pneumonia. Additionally, a urine culture revealed the presence of *Salmonella enterica* var. Enteritidis isolate T2 (hereafter SEn_T2). Finally, after empirical ceftriaxone treatment, the patient achieved clinical recovery.

2.2. Susceptibility Testing and Antibiotic Resistance Genes

SEn_T1 showed susceptibility to all the antibiotics tested. Conversely, SEn_T2 displayed resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole, oxyimino-cephalosporins and carbapenems, while showing intermediate susceptibility to ciprofloxacin. Similarly, Eclo_NDM exhibited a similar resistance profile to SEn_T2 but was resistant to ciprofloxacin (Table 1).

Table 1. Minimum inhibitory concentrations (in mg/L) and its interpretation according to CLSI 2023 (33rd Edition) breakpoints, for clinical strains, transconjugants and receptor strain.

	<i>E. cloacae</i> Eclo_NDM	<i>S. enteritidis</i> SEn_1	<i>S. enteritidis</i> SEn_2	<i>E. coli</i> TcEclo_NDM	<i>E. coli</i> TcSEn_2	<i>E. coli</i> J53-2
Ampicillin-Sulbactam	-	≤2 (S)	≥32 (R)	≥32 (R)	≥32 (R)	≤2 (S)
Piperacillin-Tazobactam	≥128 (R)	≤4 (S)	64 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)	≤4 (S)
Ceftazidime	≥64 (R)	0.25 (S)	≥64 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	0.5 (S)
Ceftazidime-Tazobactam	≥16 (R)	≤0.12 (S)	≥16 (R)	≥16 (R)	≥16 (R)	≤0.12 (S)
Ceftolozane-Tazobactam	≥32 (R)	≤0.25 (S)	16 (R)	≥32 (R)	≥32 (R)	≤0.25 (S)
Cefepime	≥32 (R)	≤0.12 (S)	16 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)	≤0.12 (S)
Aztreonam	≥64 (R)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)
Ertapenem	≥8 (R)	≤0.12 (S)	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)	≤0.12 (S)
Imipenem	8 (R)	≤0.25 (S)	8 (R)	8 (R)	4 (R)	≤0.25 (S)
Meropenem	≥16 (R)	≤0.25 (S)	≥16 (R)	8 (R)	8 (R)	≤0.25 (S)
Amikacin	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)
Ciprofloxacin	≥4 (R)	≤0.06 (S)	0.25 (I)	0.5 (I)	0.5 (I)	≤0.06 (S)

R, resistant; S, susceptible; I, intermediate.

Both SEn_T2 and Eclo_NDM displayed a DDST result consistent with metallo-β-lactamase production, which was confirmed as *bla*_{NDM} by PCR. The quinolone resistance gene *qnrA* was also detected in both isolates by PCR.

2.3. Plasmid Transfer Assays

Conjugation assays yielded positive results using either Eclo_NDM or SEn_T2 as donors. The conjugation frequency for both plasmids was $\sim 4 \times 10^{-3}$ (transconjugants/donors), which constitutes a high transfer efficiency for this type of plasmids (see below). Transconjugants (hereinafter designated as TcEclo_NDM and TcSEn_T2, respectively) showed resistance to carbapenems, ceftazidime and trimethoprim-sulfamethoxazole, and intermediate susceptibility to ciprofloxacin; furthermore, both transconjugants exhibited an 8-fold increase in MIC levels to ciprofloxacin, compared to the recipient strain (Table 1). DDST results were also compatible with metallo-β-lactamase production. Moreover, PCR assays confirmed the transfer of resistance genes *bla*_{NDM} and *qnrA*.

2.4. In Silico Analysis

After being assembled and polished, genomic DNA sequences of isolates Eclo_NDM, SEn_T1 and SEn_T2 were analyzed by online servers and standalone bioinformatic software. Carbapenem and quinolone resistance genes *bla*_{NDM-1} and *qnrA1* respectively, were detected

in both Eclo_NDM and SEn_T2, confirming PCR findings. Both strains also harbored IncC and IncFIB plasmids, which will be discussed later. All other relevant data are summarized in Table 2.

Table 2. Data of the microorganisms discussed in this work.

	Eclo_NDM	SEn_T1	SEn_T2
AMR genes	<i>aadA2, aph(3')-Ia, sul1, sul2, dfrA12, qnrA1, qacEΔ1, catA1, cmlA1, bla_{NDM-1}fosA, bla_{ACT-7},</i>	<i>aac(6')-Iaa</i>	<i>aadA2, aph(3')-Ia, sul1, sul2, dfrA12, qnrA1, qacEΔ1, catA1, cmlA1, bla_{NDM-1}aac(6')-Iaa,</i>
Plasmid incompatibility groups	IncC, IncFIB, IncR	IncFIB	IncC, IncFIB
MLST	ST146	ST11	ST11
wgMLST	NA	ST733989	ST733988
pMLST	IncFIB:ST NT IncC: ST3,9 *	IncFIB: ST_22	IncFIB: ST_22 IncC: ST3,9 *
Serovar	NA	Enteritidis	Enteritidis

* Both IncC plasmids show identical point mutations in genes *parB2* and *repA4*; numbers indicate the nearest ST matches. NT: Not typeable. NA: Not applicable.

2.5. Comparative Genomics

A genome comparison between isolates SEn_T1 and SEn_T2 revealed that both belonged to sequence-type ST11 and differed by only two mutations: one single nucleotide polymorphism (SNP) and a 777 bp insertion in the chromosome of SEn_T2. Additionally, wgMLST analysis revealed the SEn_T1 and SEn_T2 differed in 5/21,056 loci and thus belong to the same clone/strain [22]. Given that both isolates were recovered 40 days apart, these findings suggest that such minor changes between SEn_T1 and SEn_T2 likely arose within the patient's gut.

Additionally, while both isolates carried an IncF plasmid (pIncFSEn), SEn_T2 also harbored an IncC plasmid (pIncCSEn) encoding *bla_{NDM-1}* and *qnrA1*, along with other antibiotic resistance genes. These findings suggest that SEn_T1 and SEn_T2 represent the same clone and that the occurrence of plasmid pIncCSEn in SEn_T2 could be the outcome of a horizontal genetic transfer (HGT) event between Eclo_NDM and SEn_T1.

To investigate this possibility, we conducted a comparative genomic analysis between the IncC plasmids found in Eclo_NDM and SEn_T2. The analysis revealed that both plasmids were identical, strongly supporting the hypothesis that the HGT event occurred within the patient's gut.

2.6. Description of Plasmid pIncCSEn

In *S. Enterica* SEn_T2 and in *E. cloacae* Eclo_NDM, both *bla_{NDM-1}* and *qnrA1* were encoded in identical type-2 IncC plasmids, hereinafter designated pIncCSEn. Overall pIncCSEn was ~168 kb in size, had a GC% content of 52.75 and featured 210 open reading frames. The backbone of plasmid pIncCSEn spanned 122.8 kb and harbored all the necessary genes required for plasmid replication, maintenance, partitioning and conjugal transfer.

Comparison with other type-2 IncC plasmids showed that the closest match corresponded to pEc8791 (accession *n* MZ465532), obtained from a clinical *E. coli* isolate from Argentina. In this regard, pEc8791 featured different beta-lactam and fluoroquinolone resistance genes (i.e., *bla_{PER-2}*, *aac(6')-Ib-cr*) and lacked the entire mercury resistance operon and the chromate transport-encoding gene *chrA*. The second closest match corresponded to plasmid pEC8-NDM-1 (accession *n* CP060954), obtained from a carbapenem-resistant *E. coli* clinical isolate from China. Although this plasmid also carried *bla_{NDM-1}* in a complex class 1 integron, its variable regions featured different resistance genes, suggesting

like, at the left and right flank respectively. Additionally, adjacent to *IS1R* there was the chloramphenicol resistance gene *catA1*.

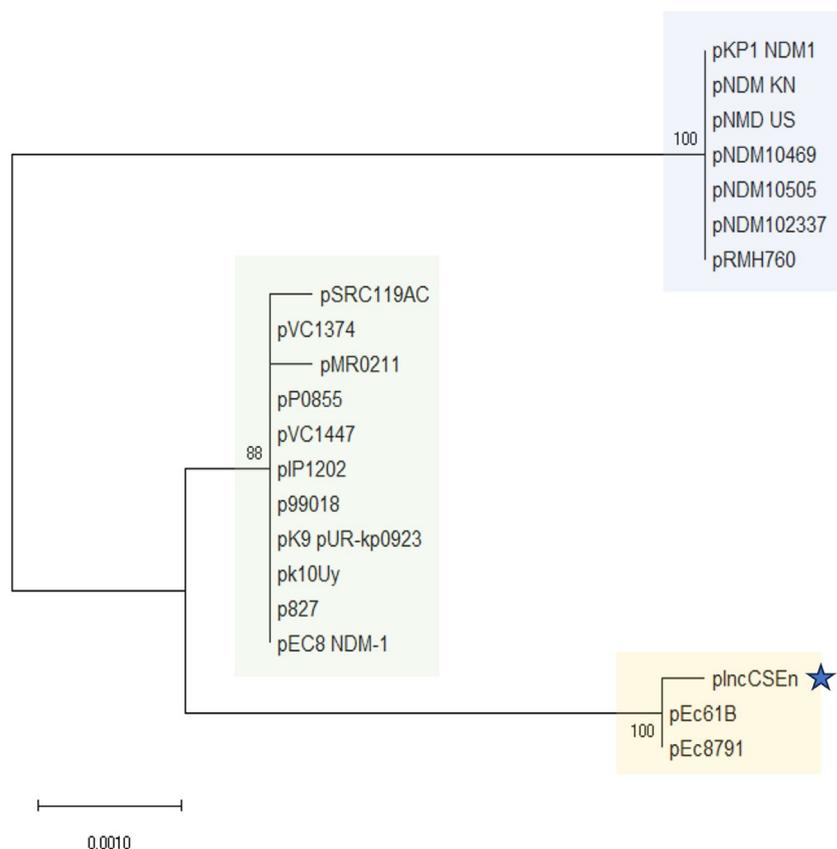


Figure 2. Evolutionary relationships of IncC plasmids. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The blue-shaded box corresponds to type-1 IncC plasmids, the green-shaded box corresponds to type-2 IncC plasmids, and the yellow-shaded box corresponds to a putative sub-lineage of IncC plasmids (the star indicates the plasmid described in this work).

The remnants of Tn21 that are part of Tn8710 in plasmid pIncSEn are divided into two fragments and will be described in accordance with the sequence and structure reported by Liebert et al. (accession number AF071413) [24]. The left segment consists of the transposition elements of Tn21, comprising *tnpA*, *tnpR*, *res* sites I, II and III, and *tnpM*, followed by class 1 integron integrase gene *intI1*. Unlike In2, which carries *aadA1* as gene cassette, the class 1 integron associated with Tn8710 carries *dfrA12* and *aadA2* in its variable region. On the other hand, the right segment of Tn2, conserved in Tn8710, includes a fragment of the Tn21-*tniA* gene, followed by the *mer* operon (*merEDACPTR*). Moreover, the central region of Tn21, comprising the class 1 integron accessory genes (*orf5*, *tniB* and part of *tniA*) and *IS1326*, *IS1353*, is missing in Tn8710, likely as the result of several insertion/deletion events probably occurred instead (Figure 3).

The class 1 integron featured by Tn8710 was associated with a tandem of two copies of *ISCR1* and their respective variable regions, thus constituting a complex class 1 integron. Accordingly, the first variable region consisted of *dfrA12-orfF-aadA2*, and was followed by the *qacEΔ1* and *sul1* tandem; the latter were continued by the first copy of *ISCR1* interrupting the gene *dsbC*, along with *trpF*, *ble*, *bla*_{NDM-1} (in reverse direction) and *ΔISAba125*. This IS was truncated by the insertion of a second *ISCR1* followed by the genes *qnrA1-cmlA1*

and another copy of *qacEΔ1-sul1*. BLASTn analysis of this structure yielded only partial matches, suggesting that this constitutes a novel genetic environment for *bla_{NDM-1}*.

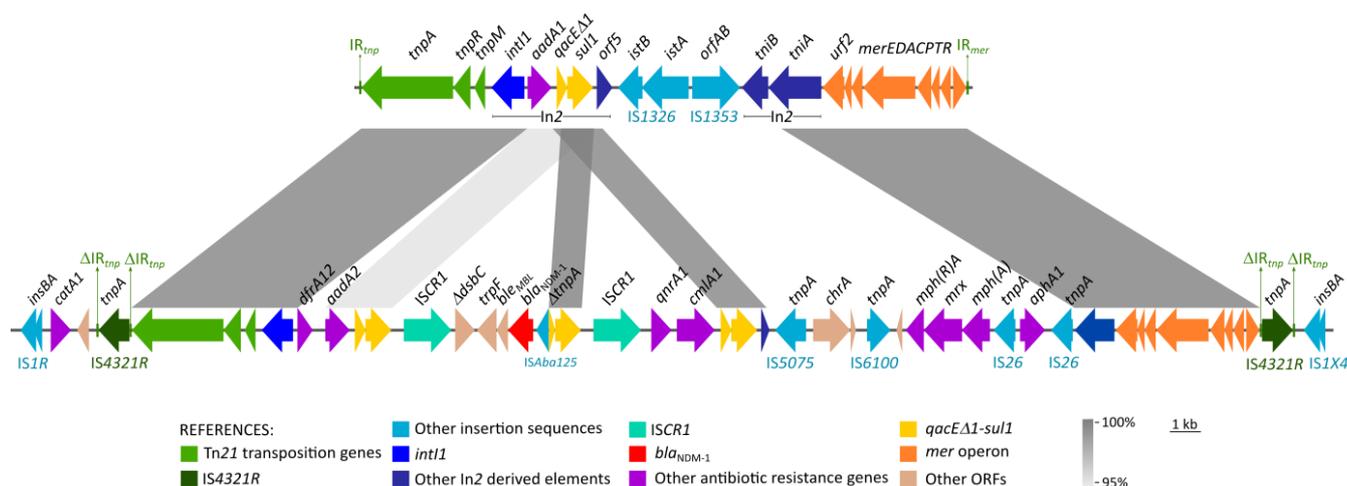


Figure 3. Linear map of ARI-A in pIncSEn, compared with the original structure of Tn21. Homologous segments are shown as grey blocks as indicated in the reference.

Downstream this complex class 1 integron, Tn8710 carried other mobile elements, including IS5075-like in reverse orientation associated with the *chrA* gene, and IS6100 followed by the macrolide resistance gene *mph(A)* and its regulators *mphR(A)* and *mrx*. Further downstream we detected Tn4352, formed by two copies of IS26 flanking the kanamycin and neomycin resistance gene *aphA1*.

Overall, the whole resistance island encompassed multiple genes conferring resistance to several antibiotics, including β -lactams (*bla_{NDM-1}*), quinolones (*qnrA1*), aminoglycosides (*aadA2*, *aphA1*), trimethoprim- sulfamethoxazole (*dfrA1* and *sul1*), chloramphenicol (*catA1*, *cmlA1*) and macrolides [*mph(A)*-*mphR(A)*-*mrx*]; moreover, this island also harbored resistance determinants to other antimicrobial compounds such as mercury (*mer* operon), quaternary ammonium (*qacEΔ1*) and bleomycin (*ble*).

3. Discussion

The success of NDM enzymes (in terms of global widespread) seems to be associated with the intracellular localization of these MBLs. In this regard, contrary to other soluble periplasmic metallo- β -lactamases, NDM is a lipoprotein that remains anchored to the inner leaflet of the outer membrane in Gram negative bacteria [25]. This peculiar localization serves two distinct functions; on the one hand, it prevents apo-enzymes (i.e., Zn²⁺-devoid NDM) from being degraded since soluble variants of NDM are less stable. On the other hand, another benefit of being anchored to the outer membrane is the secretion of NDM in outer membrane vesicles (OMV), which in turn, relieves the stress in the periplasmic space [26], and protects these enzymes against extracellular proteases and chelating agents [27]. Furthermore, these NDM-containing OMV can also alter the antimicrobial resistance profile of other bacterial populations [28].

Previous studies have suggested that the production of class B β -lactamases entailed a fitness reduction in *S. enterica*, which in turn could alter the ability of this microorganism to colonize the human gut; such biological cost could also explain the low frequency of MBL-producing *Salmonella* isolates [29]. Nevertheless, Lopez et al. argued that NDM enzymes appear to be molded by evolution to avoid imposing a biological cost on their microbial hosts, thus resulting in a rapid and widespread dissemination of these MBLs [26].

Furthermore, several authors have pointed out that *bla*_{NDM}-harboring plasmids are stably maintained even in absence of selective pressure (i.e., antibiotics) [30,31].

Although NDM-producing *Salmonella enterica* isolates have already been reported [32–34], the presence of *bla*_{NDM-1} in *S. enteritidis* is exceptional. Interestingly, Beukers et al. described the dissemination of a *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid among different isolates of different *Enterobacteriaceae* species (including an isolate of *S. enteritidis*); nevertheless, the authors were unable to obtain the susceptible receptor isolate (prior to the acquisition of the resistance plasmid) or to disclose the prescribed antibiotics that resulted in the selection or co-selection of such resistant microorganisms [34]. One of the strengths of our work is that it documents, step-by-step, the different factors, including the various selection and co-selection processes that may have ultimately led to the emergence of the carbapenem resistant SE_{En}_T2 strain. Furthermore, to the best of our knowledge, this is also the first report of an NDM-1-producing *S. Enteritidis* isolate in the Americas.

As previously stated, numerous plasmid incompatibility groups have been associated with *bla*_{NDM} genes in Enterobacterales, including type 1 and 2 IncC plasmids [35]; besides having a broad host range, these mobile genetic elements have been frequently associated with the dissemination of resistance genes within Enterobacterales [36]. In this context, the 122.8 kb backbone of plasmid pIncCSE_n was slightly shorter than similar plasmids previously reported by our group [37], however it harbored the necessary genes for plasmid replication, conjugal transfer and partitioning. Among the typical IncC features, pIncCSE_n lacked *dcm1*, probably on account of an ARI-B-related deletion, an event already described with no deleterious consequences for the plasmid [35]. Another absent element was the *rhs* gene, a common ARI-A insertion site. However, its absence does not appear to be detrimental to the plasmid, as it constitutes a hotspot for the insertion of resistance islands. Additionally, partial *rhs* deletions have been previously reported in type-1 IncC plasmids without adverse effects [38]. In the case of pIncCSE_n, the resistance island was inserted upstream of the integrase/recombinase gene *xerD*, also defined as a hotspot for antibiotic resistance island site in type 2 IncC plasmids [35].

Almost every *bla*_{NDM}-carrying IncC plasmid described so far belongs either to ST1 or ST3 in the pMLST scheme [10], however, pIncCSE_n could not be assigned to a specific sequence type on account of variations in genes *parB2* and *repA4*. This, in conjunction with the absence of *rhs2* suggests that pIncCSE_n (along with pEC8791 and pEc61B) could belong to a new sub-lineage of IncC plasmids. However, more studies are required to corroborate such a statement.

The *bla*_{NDM-1} gene present in pIncCSE_n, was embedded in a multidrug resistance island, consisting of a novel Tn21-derived transposon designated Tn7810. The Tn21-family has classically been involved in the accumulation and dissemination of antibiotic resistance genes [24]. On the other hand, *bla*_{NDM} has been found associated with a variety of genetic contexts, which usually involve diverse genetic elements such as insertion sequences and composite transposons. This gene has been found associated with the ISCR1 element, mainly as part of complex class 1 integrons, along with other antibiotic resistance genes, as those described in this work [39]. In this regard, the complex class 1 integron harboring *bla*_{NDM-1} described in the present study, constitutes a novel genetic arrangement which includes *dfrA12-aadA2*, *qnrA1*, *cmlA1* and *sul1* in a single platform. Noticeably, this resistance island contains resistance genes to all the usually prescribed antibiotics for invasive non-typhoidal salmonellosis, i.e., ampicillin, third-generation cephalosporins (*bla*_{NDM-1}), fluoroquinolones (*qnrA1*), trimethoprim-sulfamethoxazole (*dfrA12*, *sul1*), chloramphenicol (*catA1*, *cmlA1*), and azithromycin [*mph(A)*] [40].

The Tn21-terminal inverted repeats in Tn7810 were interrupted by IS4321R. This insertion sequence, along with IS4321L and IS5075, is usually found inserted in the same position

within Tn21-family transposons, impairing their capability for mobilization [41]. However, the excision of IS4321 may restore the inverted repeats, allowing the Tn21 transposition [42]. On the other hand, besides this Tn21-derived structure, other putative composite transposons were detected, flanked by homologous or identical insertion sequences such as IS4321R and IS5075, or IS26 and IS6100. These elements may be able to mobilize *bla*_{NDM-1} and other antibiotic resistance genes by forming cointegrates, promoting multiple gene transfer and co-selection [39]. The complex structure displayed by Tn7810 makes it difficult to trace the probable genetic events that originated such genetic element; in this regard, *bla*_{NDM-1} was probably mobilized by a transposon along with IS*Aba125* and then “captured” by the complex class 1 integron, in association with IS*CR1*. Other events probably involved the insertion of IS4321R in the Tn21 terminal repeats, and the acquisition of other insertion sequences or composite transposons.

Finally, the detection of an NDM-1-producing *S. Enteritidis* in the Americas highlights the ongoing evolution of carbapenem resistance in Enterobacterales. Our findings reveal a probably new IncC sub-lineage carrying *bla*_{NDM-1} within a novel Tn21-derived transposon, emphasizing the role of mobile genetic elements in resistance dissemination.

The detailed reconstruction of selection and co-selection events, fueled by usage of critically important antibiotics, provides key insights into the stability and spread of *bla*_{NDM-1}, thus reinforcing the need for improved antimicrobial stewardship, and continuous genomic surveillance to track and mitigate the expansion of carbapenem resistance, and antimicrobial resistance in general. Additionally, this case took place during the COVID-19 pandemic, a period marked by significant strain on healthcare systems. Among several contributing factors, the increased workload of infection control teams (focused primarily on limiting the spread of COVID-19 within medical facilities) led to a reduced attention to the prevention and surveillance of other infectious diseases [43]. For instance, although the patient received controlled feeding during an extended hospital stay, and bearing in mind that no other cases were detected during the same period, it is plausible that the source of his hospital-acquired salmonellosis was the introduction of contaminated food or snacks, potentially brought in by relatives or visitors following the patient’s transfer to a moderate care unit.

4. Materials and Methods

4.1. Patient

The patient was a 78-year-old male admitted to a moderate-care setting with diagnosis of COVID-19. Clinical data were collected retrospectively by reviewing the medical records. The patient signed an informed consent allowing access to such data.

4.2. Strains, Identification, and Antibiotic Susceptibility

Bacterial identification was performed by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker, Billerica, MA, USA). Antibiotic susceptibility was determined using the Vitek 2 system (bioMérieux, Marcy l’Étoile, France).

Phenotypic detection of metallo- β -lactamases, class A carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases were performed by double-disk synergy tests (DDST) with the corresponding combination of antimicrobial agents and specific inhibitor disks [44]. Minimum inhibitory concentration assays were carried out and interpreted according to CLSI guidelines [45]. Carbapenemase genes and plasmid mediated quinolone resistance genes were sought by PCR as previously described [11].

4.3. Plasmid Transfer

Plasmid transfer was assessed by conjugation assays, using *E. coli* J53-2 (*pro met* Rif^r Nal^r) as recipient. Briefly, log-phase LB broth cultures of recipient and donor strains were mixed in a 10:1 ratio and then incubated statically overnight at 37 °C [46]. Transconjugants were selected on Luria-Bertani agar plates supplemented with ceftazidime (2 µg/mL) and rifampicin (150 µg/mL), and transfer of *bla*_{NDM} and *qnrA* was verified by PCR [11]. Conjugation frequencies were determined according to Rozwandowicz M et al. [47].

4.4. Whole Genome Sequencing

Genomic DNA was extracted with the NZY microbial gDNA Isolation kit, following the manufacturer's instructions (NZYTech Genes & Enzymes, Lisbon, Portugal). DNA quality was assessed using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA), and later quantified with Qubit[®] 3.0 fluorometer and the dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Illumina libraries were prepared with the Nextera XT kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), and later sequenced using an Illumina MiniSeq device with a MiniSeq High-output reagent kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and a 2 × 151 bp paired-end strategy. Conversely, Nanopore libraries were prepared using the Rapid Sequencing Kit-SQK-RAD004, following the manufacturer's instructions; libraries were later loaded onto R.9.4.1 flow cells (FLOMIN106) and sequenced (singleplex) for 10 h on a MinION Mk1B device (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Basecalling was performed with the standalone Guppy version 6.5.7 (<https://community.nanoporetech.com>) using the high-accuracy model.

4.5. Genome Assembly

We obtained 1,998,218 Illumina reads for strain Sen_T1 (296 Mb, Cov 62,8), and 1,265,878 reads for strain Sen_T2 (183 Mb, Cov 37,5), with a Q30 = 92.2. Illumina reads were then filtered with the Fastp software v0.23.2 [48]. On the other hand, we obtained Nanopore reads equivalent to 3,2 Gb bases, with a depth ≈ 300X, for both strains, (mean read quality 7,92 (SEn_T1), and 13.2 (SEn_T2)). Accordingly, Nanopore reads were filtered using Filtlong v0.2.1 (<https://github.com/rrwick/Filtlong>, accessed on 1 November 2023), to remove reads <1000 bp and reads with a mean quality score <95. Genome hybrid assembly (using short and long reads) was carried out using the Tricycler software v0.5.3 along with Flye v2.9-b1768, Canu v2.2, Raven v1.8.1 and Unicycler v0.5.0 for subsample assembly [49–52]. The assembled consensus genomes were first polished with Medaka v1.6.1 (<https://github.com/nanoporetech/medaka>, accessed on 16 June 2024) and later with Polypolish v0.5.0 [53].

4.6. In Silico Analysis

Serotype prediction of *Salmonella enterica* isolates was done in silico with SeqSero2 v1.3.1 pipeline using the corresponding genome assemblies [54]; furthermore, the results were double checked by tetra correlation search using the JSpeciesWS web service (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#analyse>, accessed on 16 June 2024). On the other hand, prediction of antimicrobial resistance genes was carried out using the AMRFinderPlus software v3.11.18, with default parameters [55], whereas mobile genetic elements (i.e., plasmids) were detected with ABRicate v1.01 using the PlasmidFinder database (selection criteria-minimum coverage: 70%, minimum identity: 70%) (<https://github.com/tseemann/abricate>, accessed on 1 November 2023). Multilocus sequence-typing for both *S. enterica* isolates and the *E. cloacae* strain, and pMLST were predicted with the MLST 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>, accessed on 16 June 2024) and the pMLST 2.0

suites, respectively (<https://cge.food.dtu.dk/services/pMLST/>, accessed on 16 June 2024). Furthermore, wgMLST profiles for both *Salmonella enterica* isolates were obtained using the Enterobase v1.2.0 suite (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>, accessed on 11 June 2025); in this sense, long and short fastq reads of both isolates were uploaded onto and assembled using the Enterobase webpage, and profiled using a 21,056-loci scheme. Conversely, genome annotation and plasmid annotation using the RAST 2.0 webpage [56] and manually curated with the Artemis software [57]. Finally, identification of putative orthologs and pangenome analysis was performed with the Roary v.3.11.2 package [58], whereas mutation assessment (i.e., detection of SNPs and/or insertions/deletions) was carried out with the breseq/gdtools v0.38.1 pipeline, using the default parameters [59].

Comparisons with nucleotide sequences available in public databases were performed with BLASTn v2.16.0 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, accessed on 15 July 2024), and physical maps were generated using EasyFig 2.1 and the Proksee-Genome Analysis web tool (<https://proksee.ca/>).

Raw Fastq sequences were deposited in Genbank under Bioproject accession number PRJNA950342.

4.7. Phylogenetic Analysis

Nucleotide sequences of genes *repA*, *parA*, *parB* and locus A053 were extracted, and conjoined, from plasmids publicly available online. Sequence alignment, and dendrogram were performed with MEGA X [60]. In this regard, the evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method, with a 500-replicate bootstrap test [61,62]; the evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method considering the number of base substitutions per site [63].

Author Contributions: Conceptualization, N.F.C. and R.V.; methodology, N.F.C., I.B., M.N.C. and R.V.; software, N.F.C. and G.T.; validation, R.P.-E. and I.B.; formal analysis, N.F.C. and G.T.; investigation, N.F.C., M.L., P.H., M.N.C., M.L.-V., A.O., V.G.-F. and L.C.; resources, C.M., R.V., P.H., M.L. and L.C.; data curation, N.F.C., G.T., M.N.C. and M.L.-V.; writing—original draft preparation, N.F.C., R.V., R.P.-E., V.G.-F., I.B., A.O., M.L. and L.C.; writing—review and editing, N.F.C., I.B., R.V., R.P.-E. and C.M.; visualization, V.G.-F., R.P.-E. and N.F.C.; supervision, R.V. and C.M.; project administration, R.V. and C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Since no additional interventions were performed in the study or patient treatment and the patient’s anonymity was maintained at all times, ethical review and approval for this study were waived.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the patient involved in the study.

Data Availability Statement: Raw Fastq sequence are openly available in Genbank under Bioproject accession number PRJNA950342 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA950342/> (accessed on 16 June 2024)), and in Enterobase with the same accession number (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica> (accessed on 16 June 2024)).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Andino, A.; Hanning, I. Salmonella Enterica: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *Sci. World J.* **2015**, *2015*, 520179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Shane, A.L.; Mody, R.K.; Crump, J.A.; Tarr, P.I.; Steiner, T.S.; Kotloff, K.; Langley, J.M.; Wanke, C.; Warren, C.A.; Cheng, A.C.; et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65*, e45–e80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Medalla, F.; Gu, W.; Mahon, B.E.; Judd, M.; Folster, J.; Griffin, P.M.; Hoekstra, R.M. Estimated Incidence of Antimicrobial Drug-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Infections, United States, 2004–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *23*, 29–37. [[CrossRef](#)]
4. Coppola, N.; Freire, B.; Umpiérrez, A.; Cordeiro, N.F.; Ávila, P.; Trenchi, G.; Castro, G.; Casaux, M.L.; Fraga, M.; Zunino, P.; et al. Transferable Resistance to Highest Priority Critically Important Antibiotics for Human Health in *Escherichia Coli* Strains Obtained From Livestock Feces in Uruguay. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 588919. [[CrossRef](#)]
5. Cordeiro, N.F.; Nabón, A.; García-Fulgueiras, V.; Álvez, M.; Sirok, A.; Camou, T.; Vignoli, R. Analysis of Plasmid-Mediated Quinolone and Oxyimino-Cephalosporin Resistance Mechanisms in Uruguayan *Salmonella Enterica* Isolates from 2011–2013. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2016**, *6*, 165–171. [[CrossRef](#)]
6. Casaux, M.L.; D’Alessandro, B.; Vignoli, R.; Fraga, M. Phenotypic and Genotypic Survey of Antibiotic Resistance in *Salmonella Enterica* Isolates from Dairy Farms in Uruguay. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1055432. [[CrossRef](#)]
7. World Organisation for Animal Health. *Eighth Annual Report on Antimicrobial Agents Intended for Use in Animals*; World Organisation for Animal Health: Paris, France, 2024.
8. Mthembu, T.P.; Zishiri, O.T.; El Zowalaty, M.E. Genomic Characterization of Antimicrobial Resistance in Food Chain and Livestock-Associated *Salmonella* Species. *Animals* **2021**, *11*, 872. [[CrossRef](#)]
9. Dortet, L.; Poirel, L.; Nordmann, P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 249856. [[CrossRef](#)]
10. Wu, W.; Feng, Y.; Tang, G.; Qiao, F.; McNally, A.; Zong, Z. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00115–e00118. [[CrossRef](#)]
11. Papa-Ezdra, R.; Caiata, L.; Palacio, R.; Outeda, M.; Cabezas, L.; Bálsamo, A.; Vignoli, R.; Bado, I.; Seija, V. Prevalence and Molecular Characterisation of Carbapenemase-Producing Enterobacterales in an Outbreak-Free Setting in a Single Hospital in Uruguay. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *24*, 58–62. [[CrossRef](#)]
12. Sekizuka, T.; Inamine, Y.; Segawa, T.; Kuroda, M. Characterization of NDM-5- and CTX-M-55-Coproducing *Escherichia coli* GSH8M-2 Isolated from the Effluent of a Wastewater Treatment Plant in Tokyo Bay. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2243–2249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Walsh, T.R.; Weeks, J.; Livermore, D.M.; Toleman, M.A. Dissemination of NDM-1 Positive Bacteria in the New Delhi Environment and Its Implications for Human Health: An Environmental Point Prevalence Study. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 355–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lincopan, N.; Fuentes-Castillo, D.; Espinoza-Muñoz, M.; Gonzales-Zubiarte, F.; Gonzales-Escalante, E.; Maturrano, L.; Vignoli, R.; Di Conza, J.; Gutkind, G. WHO Critical Priority *Escherichia Coli* in Latin America: A One Health Challenge for a Post-Pandemic World. In *Trending Topics in Escherichia coli Research*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2023; pp. 1–32.
15. Köck, R.; Daniels-Haardt, I.; Becker, K.; Mellmann, A.; Friedrich, A.W.; Mevius, D.; Schwarz, S.; Jurke, A. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Wildlife, Food-Producing, and Companion Animals: A Systematic Review. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 1241–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Liu, X.; Geng, S.; Chan, E.W.-C.; Chen, S. Increased Prevalence of *Escherichia Coli* Strains from Food Carrying *Bla*_{NDM} and *Mcr-1*-Bearing Plasmids That Structurally Resemble Those of Clinical Strains, China, 2015 to 2017. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800113. [[CrossRef](#)]
17. Briet, A.; Helsens, N.; Delannoy, S.; Debuiche, S.; Brisabois, A.; Midelet, G.; Granier, S.A. NDM-1-Producing *Vibrio Parahaemolyticus* Isolated from Imported Seafood. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 2578–2579. [[CrossRef](#)]
18. Zeng, Z.; Lei, L.; Li, L.; Hua, S.; Li, W.; Zhang, L.; Lin, Q.; Zheng, Z.; Yang, J.; Dou, X.; et al. In Silico Characterization of *Bla*_{NDM}-Harboring Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1008905. [[CrossRef](#)]
19. Ambrose, S.J.; Harmer, C.J.; Hall, R.M. Evolution and Typing of IncC Plasmids Contributing to Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Plasmid* **2018**, *99*, 40–55. [[CrossRef](#)]
20. Zhang, Y.; Lei, C.-W.; Chen, X.; Yao, T.-G.; Yu, J.-W.; Hu, W.-L.; Mao, X.; Wang, H.-N. Characterization of IncC Plasmids in Enterobacterales of Food-Producing Animals Originating from China. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 580960. [[CrossRef](#)]
21. Romina, P.-E.; Lucía, A.; Leticia, C.; Federica, F.; Pablo, Á.; Verónica, S.; Antonio, G.; Inés, B.; Rafael, V. In Vitro Effectiveness of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Aztreonam on Carbapenemase-Producing Enterobacterales. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2023**, *35*, 62–66. [[CrossRef](#)]
22. Schürch, A.C.; Arredondo-Alonso, S.; Willems, R.J.L.; Goering, R.V. Whole Genome Sequencing Options for Bacterial Strain Typing and Epidemiologic Analysis Based on Single Nucleotide Polymorphism versus Gene-by-Gene-Based Approaches. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 350–354. [[CrossRef](#)]
23. Grant, J.R.; Enns, E.; Marinier, E.; Mandal, A.; Herman, E.K.; Chen, C.; Graham, M.; Van Domselaar, G.; Stothard, P. Proksee: In-Depth Characterization and Visualization of Bacterial Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, W484–W492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liebert, C.A.; Hall, R.M.; Summers, A.O. Transposon Tn21, Flagship of the Floating Genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 507–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. González, L.J.; Bahr, G.; Nakashige, T.G.; Nolan, E.M.; Bonomo, R.A.; Vila, A.J. Membrane Anchoring Stabilizes and Favors Secretion of New Delhi Metallo- β -Lactamase. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 516–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. López, C.; Ayala, J.A.; Bonomo, R.A.; González, L.J.; Vila, A.J. Protein Determinants of Dissemination and Host Specificity of Metallo- β -Lactamases. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3617. [[CrossRef](#)]
27. Pasteran, F.; Gonzalez, L.J.; Albornoz, E.; Bahr, G.; Vila, A.J.; Corso, A. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 640–649. [[CrossRef](#)]
28. Yoon, H. Bacterial Outer Membrane Vesicles as a Delivery System for Virulence Regulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 1343–1347. [[CrossRef](#)]
29. Cordeiro, N.F.; Chabalgoity, J.A.; Yim, L.; Vignoli, R. Synthesis of Metallo- β -Lactamase VIM-2 Is Associated with a Fitness Reduction in *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6528–6535. [[CrossRef](#)]
30. Paul, D.; Bhattacharjee, A.; Bhattacharjee, D.; Dhar, D.; Maurya, A.P.; Chakravarty, A. Transcriptional Analysis of *Bla* NDM-1 and Copy Number Alteration under Carbapenem Stress. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2017**, *6*, 26. [[CrossRef](#)]
31. Hadziabdic, S.; Fischer, J.; Borowiak, M.; Malorny, B.; Juraschek, K.; Kaesbohrer, A.; Guerra, B.; Deneke, C.; Gonzalez-Zorn, B.; Szabo, I. The *Bla*_{NDM-1}-Carrying IncA/C₂ Plasmid Underlies Structural Alterations and Cointegrate Formation In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00380-19. [[CrossRef](#)]
32. Wang, J.; Jiang, Y.; Mei, C.-Y.; Wang, Z.-Y.; Zhong, F.-G.; Zhang, X.-X.; Lv, L.-C.; Lu, M.-J.; Wu, H.; Jiao, X. Characterization of an Extensively Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Indiana Strain Harboring Chromosomal *Bla*_{NDM-9} in China. *Infect. Drug Resist.* **2022**, *15*, 2015–2019. [[CrossRef](#)]
33. Huang, Y.; Ma, X.; Zeng, S.; Fu, L.; Xu, H.; Li, X. Emergence of a *Salmonella* Rissen ST469 Clinical Isolate Carrying *Bla*_{NDM-13} in China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 936649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Beukers, A.G.; John, M.A.; Davis, R.; Lee, A.; van Hal, S.J. Hospital Outbreak of New Delhi Metallo- β -Lactamase Type-1 (NDM-1) in *Salmonella* Enterica with Inter-Species Plasmid Transmission. *J. Hosp. Infect.* **2021**, *117*, 23–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Harmer, C.J.; Hall, R.M. The A to Z of A/C Plasmids. *Plasmid* **2015**, *80*, 63–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sarkar, A.; Pazhani, G.P.; Chowdhury, G.; Ghosh, A.; Ramamurthy, T. Attributes of Carbapenemase Encoding Conjugative Plasmid PNDM-SAL from an Extensively Drug-Resistant *Salmonella* Enterica Serovar Senftenberg. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 969. [[CrossRef](#)]
37. Papa-Ezdra, R.; Cordeiro, N.F.; Di Pilato, V.; Chiarelli, A.; Pallecchi, L.; Garcia-Fulgueiras, V.; Vignoli, R. Description of Novel Resistance Islands Harboring *Bla*CTX-M-2 in IncC Type 2 Plasmids. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *26*, 37–41. [[CrossRef](#)]
38. Harmer, C.J.; Hall, R.M. PRMH760, a Precursor of A/C₂ Plasmids Carrying *Bla*_{CMY} and *Bla*_{NDM} Genes. *Microb. Drug Resist.* **2014**, *20*, 416–423. [[CrossRef](#)]
39. Acman, M.; Wang, R.; van Dorp, L.; Shaw, L.P.; Wang, Q.; Luhmann, N.; Yin, Y.; Sun, S.; Chen, H.; Wang, H.; et al. Role of Mobile Genetic Elements in the Global Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *Bla*_{NDM}. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1131. [[CrossRef](#)]
40. Hajra, D.; Nair, A.V.; Chakravorty, D. Decoding the Invasive Nature of a Tropical Pathogen of Concern: The Invasive Non-Typhoidal *Salmonella* Strains Causing Host-Restricted Extraintestinal Infections Worldwide. *Microbiol. Res.* **2023**, *277*, 127488. [[CrossRef](#)]
41. Partridge, S.R.; Hall, R.M. The IS1111 Family Members IS4321 and IS5075 Have Subterminal Inverted Repeats and Target the Terminal Inverted Repeats of Tn21 Family Transposons. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 6371–6384. [[CrossRef](#)]
42. Tijet, N.; Andres, P.; Chung, C.; Lucero, C.; Low, D.E.; Galas, M.; Corso, A.; Petroni, A.; Melano, R.G. *RmtD2*, a New Allele of a 16S rRNA Methylase Gene, Has Been Present in *Enterobacteriaceae* Isolates from Argentina for More than a Decade. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 904–909. [[CrossRef](#)]
43. Thomas, G.R.; Corso, A.; Pasterán, F.; Shal, J.; Sosa, A.; Pillonetto, M.; de Souza Peral, R.T.; Hormazábal, J.C.; Araya, P.; Saavedra, S.Y.; et al. Increased Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriales Bacteria in Latin America and the Caribbean during the COVID-19 Pandemic. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Martínez-Martínez, L.; Cantón Spain, R.; Stefani, S.; Skov, R.; Glupczynski, Y.; Nordmann, P.; Wootton, M.; Miriagou, V.; Skov Simonsen, G. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance*; EUCAST: Växjö, Sweden, 2017.
45. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; CLSI: Wayne, PA, USA, 2023; Volume 33, ISBN 0956-4624.
46. Shin, S.Y.; Kwon, K.C.; Park, J.W.; Song, J.H.; Ko, Y.H.; Sung, J.Y.; Shin, H.W.; Koo, S.H. Characteristics of *Aac*(6′)-*Ib*-*Cr* Gene in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Chungnam Area. *Ann. Lab. Med.* **2009**, *29*, 541–550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rozwandowicz, M.; Brouwer, M.S.M.; Mughini-Gras, L.; Wagenaar, J.A.; Gonzalez-Zorn, B.; Mevius, D.J.; Hordijk, J. Successful Host Adaptation of IncK2 Plasmids. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Chen, S.; Zhou, Y.; Chen, Y.; Gu, J. Fastp: An Ultra-Fast All-in-One FASTQ Preprocessor. *Bioinformatics* **2018**, *34*, i884–i890. [[CrossRef](#)]
49. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Cerdeira, L.T.; Hawkey, J.; Méric, G.; Vezina, B.; Wyres, K.L.; Holt, K.E. Tricycler: Consensus Long-Read Assemblies for Bacterial Genomes. *Genome Biol.* **2021**, *22*, 266. [[CrossRef](#)]
50. Wick, R.R.; Judd, L.M.; Gorrie, C.L.; Holt, K.E. Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies from Short and Long Sequencing Reads. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005595. [[CrossRef](#)]
51. Kolmogorov, M.; Yuan, J.; Lin, Y.; Pevzner, P.A. Assembly of Long, Error-Prone Reads Using Repeat Graphs. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 540–546. [[CrossRef](#)]
52. Vaser, R.; Šikić, M. Time- and Memory-Efficient Genome Assembly with Raven. *Nat. Comput. Sci.* **2021**, *1*, 332–336. [[CrossRef](#)]
53. Wick, R.R.; Holt, K.E. Polypolish: Short-Read Polishing of Long-Read Bacterial Genome Assemblies. *PLoS Comput. Biol.* **2022**, *18*, e1009802. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, S.; den Bakker, H.C.; Li, S.; Chen, J.; Dinsmore, B.A.; Lane, C.; Lauer, A.C.; Fields, P.I.; Deng, X. SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Appl. Env. Microbiol.* **2019**, *85*, e01746-19. [[CrossRef](#)]
55. Feldgarden, M.; Brover, V.; Gonzalez-Escalona, N.; Frye, J.G.; Haendiges, J.; Haft, D.H.; Hoffmann, M.; Pettengill, J.B.; Prasad, A.B.; Tillman, G.E.; et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog Facilitate Examination of the Genomic Links among Antimicrobial Resistance, Stress Response, and Virulence. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 12728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid Annotations Using Subsystems Technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Carver, T.; Harris, S.R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J.A. Artemis: An Integrated Platform for Visualization and Analysis of High-Throughput Sequence-Based Experimental Data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 464–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [[CrossRef](#)]
59. Deatherage, D.E.; Barrick, J.E. Identification of Mutations in Laboratory-Evolved Microbes from Next-Generation Sequencing Data Using Breseq. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1151*, 165–188.
60. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Nnyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]
61. Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791. [[CrossRef](#)]
62. Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. [[CrossRef](#)]
63. Tamura, K.; Nei, M.; Kumar, S. Prospects for Inferring Very Large Phylogenies by Using the Neighbor-Joining Method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 11030–11035. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.