



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**ANÁLISIS EPIDEMIOLOGICO MOLECULAR *in silico* DEL
GENOTIPO ST213 DE *Salmonella enterica***

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**

PRESENTA

M. en C. ELDA ARACELI HERNÁNDEZ DÍAZ

DIRECTOR:

D. en C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

CO-DIRECTORA:

D. en C. MA. SOLEDAD VÁZQUEZ GARCIDUEÑAS



Agosto de 2023

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el laboratorio de Genética Molecular Microbiana de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, ambos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo y la D. en C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas. Se contó con el apoyo del CONAHCyT mediante la beca otorgada para la realización de estudios de Doctorado (Núm. Becario 731999).

COMITÉ TUTORAL:

D. en C. JOEL EDMUNDO LÓPEZ MEZA

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

D. en C. OMAR CHASSIN NORIA

**Facultad de Biología
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**

D. en C. JESÚS NAVAS MÉNDEZ

**Departamento de Biología Molecular
Universidad de Cantabria, España**

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VII
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Enfermedades de transmisión alimentaria	1
I.2. Género <i>Salmonella</i>	2
I.3. Epidemiología de <i>Salmonella</i> no tifoidea	3
I.3.1 Morbilidad y mortalidad	3
I.3.2 Epidemiología	4
I.3.3 Distribución de serotipos	5
I.3.4 <i>Salmonella enterica subespecie enterica serotipo Typhimurium</i>	8
I.3.5 Patogenia por <i>Salmonella enterica subespecie enterica serotipo Typhimurium</i>	10
I.4. Métodos para la tipificación de <i>Salmonella</i>	12
I.5. Tipificación de <i>S. enterica</i> mediante secuenciación genómica	15
I.6. El reloj molecular y su relevancia epidemiológica en <i>Salmonella enterica</i>	17
I.7. El pangenoma de <i>Salmonella enterica</i>	19
I.8 Referencias bibliográficas	22
II. JUSTIFICACIÓN	30
III. HIPÓTESIS	31
IV. OBJETIVOS	31
IV.1 Objetivo General	31
IV.2 Objetivos específicos	31
V. ESTRATEGIA GENERAL	32
VI. RESULTADOS	33
CAPÍTULO I. Epidemiología genómico-molecular de los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium en México	34
Resumen	34
Introducción	35
Material y Métodos	37
<i>Genomas obtenidos de bases de datos</i>	37
<i>Secuenciación del genoma de nuevas cepas mexicanas de S. enterica</i>	37
<i>Análisis bioinformático</i>	38
<i>Análisis de genes asociados a virulencia y resistencia a antibióticos</i>	39
<i>Distribución de genoma accesorio</i>	39
<i>Reconstrucción filogenética y diagnóstico de señal temporal</i>	40
<i>Construcción de redes de transmisión</i>	40
<i>Reconstrucción de la filogenia de datada</i>	41
Resultados	42
<i>Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en los genomas de las cepas de genotipos ST19 y ST213 de México</i>	43
<i>Distribución de genes de resistencia a antibióticos por tipo de muestra</i>	46
<i>Distribución de genes relacionados con virulencia en genomas de cepas de los genotipos ST19 y ST213 aisladas en México</i>	49

<i>Patrones de agrupamiento con base en genes de virulencia en genomas de cepas de los genotipos ST19 y ST213 de México</i>	50
<i>Agrupamiento por genoma accesorio</i>	53
<i>Dinámica de propagación de los genotipos ST19 y ST213 en México</i>	53
<i>Análisis filogenómico de las cepas de genotipo ST19 y ST213 de México</i>	55
<i>Filogenia datada del genotipo ST213 en México</i>	55
Discusión	57
<i>Los genotipos ST19 y ST213 de S. Typhimurium en México portan distinto conjunto de genes de resistencia a antibióticos</i>	59
<i>Los genotipos ST19 y ST213 de S. Typhimurium en México portan un conjunto de genes de virulencia similares</i>	63
<i>Los genotipos ST19 y ST213 presentan un genoma accesorio diferenciado, en parte asociado a sus diferencias en las dinámicas de transmisión</i>	65
<i>Los genotipos ST19 y ST213 han experimentado trayectorias evolutivas independientes desde la primera mitad del siglo XX</i>	66
Conclusión	68
Referencias bibliográficas	68
Material Suplementario	76
CAPÍTULO II. Comparative genomic analysis discloses differential distribution of antibiotic resistance determinants between worldwide strains of the emergent ST213 genotype of <i>Salmonella</i> Typhimurium	82
Abstract	82
1. Introduction	82
2. Results	84
2.1. Distribution of the Genomes of the Strains Analyzed by Country, Type of Sample and Year of Isolation	84
2.2. Presence of Antibiotic Resistance Genes	85
2.3. Antibiotic Resistance Mutations	87
2.4. Plasmid Replicons Detection	88
2.5. Grouping Patterns	88
3. Discussion	93
4. Materials and Methods	97
4.1. Data Retrieval	97
4.2. Bioinformatic Analysis	98
4.3. Data Analysis	98
5. Conclusions	98
References	99
Supplementary Materials	105
CAPÍTULO III. Análisis epidemiológico molecular de cepas globales del genotipo emergente ST213 de <i>Salmonella</i> Typhimurium	117
Resumen	117
Introducción	118
Material y Métodos	120
<i>Genomas obtenidos de bases de datos</i>	120
<i>Análisis bioinformático</i>	120
<i>Análisis de genes asociados a virulencia y resistencia a antibióticos</i>	121
<i>Generación del pangenoma de las cepas globales del genotipo ST213</i>	121

<i>Reconstrucción filogenética y diagnóstico de señal temporal</i>	122
<i>Reconstrucción de la filogenia de datada</i>	123
<i>Construcción de redes de transmisión</i>	124
Resultados	124
<i>Pangenoma del genotipo ST213 de Salmonella Typhimurium</i>	124
<i>Presencia de genes relacionados con virulencia en los genomas de las cepas ST213 globales</i>	125
<i>Patrones de agrupación con base en genes de virulencia en genomas ST213 a nivel global</i>	127
<i>Filogenia datada del genotipo ST213 de S. Typhimurium</i>	130
<i>Dinámica de propagación del genotipo ST213 a nivel mundial</i>	134
Discusión	136
Conclusión	143
Referencias bibliográficas	144
Material Suplementario	151
VII. DISCUSIÓN GENERAL	161
Referencias bibliográficas	165
VIII. CONCLUSIÓN	168
Artículo: Diagnóstico de enfermedades bacterianas: Evolución de técnicas	169

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I	Epidemiología genómico-molecular de los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium en México	
Tabla 1	Información de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> cuyos genomas fueron obtenidos en el presente trabajo	38
Tabla 2	Genes de resistencia a antibióticos encontrados en los genomas de cepas de genotipos ST19 y ST213 de México.	44
Tabla 3	Perfiles genómicos de virulencia (PGV) de los genomas ST19 y ST213 en este estudio	50
Tabla 4	Frecuencia de los genes de virulencia identificados en los genomas aquí analizados	51
Tabla S1	Metadatos de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> ST19 y 213 aisladas en México cuyos genomas se analizaron en este trabajo	76
Tabla S2	Parámetros de calidad de los genomas ensamblados en este trabajo y obtenidos de las bases de datos de cepas del genotipo ST19 y ST213 de <i>S. Typhimurium</i> aisladas en México	78
Tabla S3	Frecuencia de los genes de resistencia encontrados en los genomas ST19 y ST213 en México	80
Tabla S4	Perfiles genómicos de virulencia (PGV) de los genomas ST19 y ST213 en este estudio	81
CAPÍTULO II	Comparative genomic analysis discloses differential distribution of antibiotic resistance determinants between worldwide strains of the emergent ST213 genotype of <i>Salmonella Typhimurium</i>	
Table 1	Resistance genes found in the analyzed genomes of ST213 strains	86
Table 2	Mutations associated with antibiotic resistance in the analyzed genomes	87
Supplementary Table S1	Data of analyzed genomes in the present work	105
Supplementary Table S2	Data of ST213 genotype draft genomes obtained from Enterobase	111
Supplementary Table S3	Data of ST213 genotype draft genomes assembled in this work	112
CAPÍTULO III	Análisis epidemiológico molecular de cepas globales del genotipo emergente ST213 de <i>Salmonella Typhimurium</i>	
Tabla 1	Pangenoma de <i>S. Typhimurium</i> genotipo ST213	124
Tabla 2	Perfiles genéticos de virulencia (PGVs) 1 al 6 de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> genotipo ST213	127
Tabla S1	Metadatos de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> ST213 analizadas en este trabajo, previamente no reportadas en Hernández-Díaz et al. (2022)	151
Tabla S2	Parámetros de calidad de los genomas ensamblados en este trabajo y obtenidos de las bases de datos de cepas del genotipo ST213 de <i>S. Typhimurium</i> aisladas en México, previamente no	152

	reportadas en Hernández-Díaz et al. (2022)	
Tabla S3	Frecuencia de los genes de virulencia identificados en los genomas ST213 de <i>S. Typhimurium</i> incluidos en este estudio	153
Tabla S4	Genes de virulencia identificados en los genomas analizados	154
Tabla S5	Perfiles genéticos de virulencia (PGVs) 7 al 33 de las cepas de <i>S. Typhimurium</i> genotipo ST213	156

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN		
Figura 1	Distribución global de los 5 principales serotipos de NTS asociados con enfermedades clínicas en humanos notificados de 2004 a 2016	6
Figura 2	Modelo de interacción de <i>S. Typhimurium</i> con el epitelio intestinal	13
ESTRATEGIA GENERAL		32
CAPÍTULO I	Epidemiología genómico-molecular de los genotipos ST19 y ST213 de <i>Salmonella enterica</i> serotipo Typhimurium en México	
Figura 1	Análisis de la señal temporal de la filogenia ML de las cepas de <i>S. enterica</i> estudiadas	41
Figura 2	Genotipos de <i>Salmonella</i> Typhimurium determinados mediante Secuencia Tipo reportados en México	42
Figura 3	Distribución por tipo de muestra de las cepas de los genotipos ST19 y ST213 de <i>S. Typhimurium</i> aisladas en México cuyos genomas se analizaron en este trabajo	43
Figura 4	Patrón de agrupamiento por tipo de muestra con base en genes de resistencia a antibióticos identificados en los genomas de las cepas ST19 y ST213 analizadas en este trabajo	47
Figura 5	Patrón de agrupamiento de 46 genes de resistencia identificados en los genomas de las cepas ST19 y ST213 analizadas en este trabajo	48
Figura 6	Patrón de agrupamiento de los genomas de las cepas ST19 y ST213 con base en la distribución de genes de virulencia	51
Figura 7	Patrón de agrupación de los genes de virulencia identificados en los genomas de las cepas ST19 y ST213	52
Figura 8	Representación gráfica de cercanía de acuerdo con el genoma accesorio de los genomas ST19 y ST213 analizados en este trabajo	53
Figura 9	Redes de transmisión de <i>Salmonella</i> Typhimurium y los genotipos ST19 y ST213 en México	54
Figura 10	Filogenia de Máxima Verosimilitud construida a partir del alineamiento del genoma núcleo de las cepas ST19 y ST213 obtenido con Roary	56
Figura 11	Filogenia datada del genotipo ST213 de <i>S. Typhimurium</i> en México	58
CAPÍTULO II	Comparative genomic analysis discloses differential distribution of antibiotic resistance determinants between worldwide strains of the emergent ST213 genotype of <i>Salmonella</i> Typhimurium	

Figure 1	World distribution of the <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium strain genotype ST213, the genomes of which were analyzed in this work	84
Figure 2	Sample Type provenance of the ST213 strains from which genomes were analyzed in this work	85
Figure 3	Year of isolation of the ST213 strains from which genomes were analyzed in this work	85
Figure 4	Grouping pattern by country of isolation and resistance genes identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work	89
Figure 5	Grouping pattern by type of sample of isolation and resistance gene identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work	90
Figure 6	Grouping pattern by strain (A) and resistance gene (B) identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work	91
Figure 7	Grouping pattern by strain and plasmid presence/absence in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work	92
Figure 8	Data retrieval and exclusion criteria used for the analyzed genomes	97
CAPÍTULO III	Análisis epidemiológico molecular de cepas globales del genotipo emergente ST213 de <i>Salmonella</i> Typhimurium	
Figura 1	Análisis de la señal temporal de la filogenia ML de las cepas de <i>S. enterica</i> estudiadas	123
Figura 2	Patrón de agrupamiento por tipo de muestra de los genomas del genotipo ST213 con base en los genes de virulencia	128
Figura 3	Patrón de agrupación de los genes de virulencia identificados en los genomas aquí analizados por país de origen	129
Figura 4	Patrón de agrupamiento de los genes de virulencia identificados en los genomas de las cepas de genotipo ST213 aquí analizados	130
Figura 5	Filogenia datada colapsada de <i>S. Typhimurium</i> ST213	131
Figura 6	Filogenia datada con ramificaciones colapsadas del Clado I de <i>S. Typhimurium</i> ST213	132
Figura 7	Filogenia datada con ramificaciones colapsadas del Clado II de <i>S. Typhimurium</i> ST213	133
Figura 8	Red de transmisión global de <i>Salmonella</i> Typhimurium ST213	135
Figura S1	Clado I de la filogenia datada de <i>Salmonella</i> Typhimurium ST213 global	159
Figura S2	Clado II de la filogenia datada de <i>Salmonella</i> Typhimurium ST213 global	160

RESUMEN

La especie *Salmonella enterica* incluye a seis subespecies, siendo la subespecie *enterica* la principal responsable de infecciones en animales y humanos, representando un grave problema de salud pública a nivel mundial. Este patógeno es uno de los agentes etiológicos más comúnmente asociados a enfermedades de transmisión alimentaria, ocasionando 93.8 millones casos de infecciones gastrointestinales humanas al año, de las cuales 150 000 resultan en decesos. La tipificación tradicional de *S. enterica* subsp. *enterica* en estudios epidemiológicos se ha realizado mediante el esquema Kauffmann-White-Le Minor para asignar cepas a un serotipo específico de los aproximadamente 1547 serotipos descritos. El serotipo Typhimurium y sus variantes monofásicas se encuentran dentro de los cinco serotipos más prevalentes en distintas regiones del mundo, aislándose frecuentemente de muestras humanas, animales, alimentarias y ambientales. Se ha observado que algunos serotipos muestran la misma fórmula antigénica, por lo que se requiere de técnicas adicionales para la diferenciación de cepas y el análisis de los mecanismos asociados al surgimiento y dispersión de variantes específicas. Diversas técnicas genético-moleculares se han utilizado con tal fin, entre las que se encuentra la genotipificación por Multi Locus Sequence Typing (MLST), que reveló a la Secuencia Tipo 19 (ST19) como el genotipo fundador del resto de Secuencias Tipo (STs) dentro del serotipo Typhimurium, siendo el serotipo y genotipo más abundantes y ampliamente distribuidos a nivel global. Recientemente se ha reportado el desplazamiento del genotipo ST19 por el genotipo la ST313 en África o el ST34 emergente en Asia, identificándose en estos determinantes genéticos de resistencia múltiple a antibióticos y virulencia que los hacen de relevancia en salud pública. Dada la relación clonal estrecha entre cepas del mismo genotipo, la evaluación de las relaciones epidemiológicas a este nivel de diferenciación solo es posible mediante el análisis genómico comparativo. En México se identificó a la ST213 por primera vez como genotipo emergente de relevancia en salud pública y aunque actualmente se ha reportado su presencia en 13 países, solo se ha documentado en México la tendencia del desplazamiento de la ST19 por la ST213. En este genotipo emergente se ha documentado la presencia del gen *bla_{CMY-2}* y su relación con la resistencia a ceftriaxona, así como diferencias de resistencia a condiciones de estrés entre los genotipos ST19 y ST213. Actualmente está disponible un número relevante de genomas de cepas del genotipo ST213 de México y globales, lo que posibilita la realización de un análisis genómico comparativo para evaluar su relevancia en salud pública. En este trabajo se analizaron las relaciones genómico-epidemiológicas del genotipo ST213 de *Salmonella* Typhimurium para establecer las relaciones clonales entre cepas de distintas regiones geográficas, establecer hipótesis sobre el surgimiento del genotipo, sus posibles patrones de dispersión y la distribución de determinantes genéticos de relevancia en salud pública. Se analizaron de manera independiente 63 genomas del genotipo ST19 y 83 genomas del genotipo ST213 de cepas aisladas en México, procedentes de distintos tipos de muestra y de distintos años de aislamiento, incluidas 11 cepas del estado de Michoacán cuyos genomas se obtuvieron en este trabajo. Un alto porcentaje de cepas de ambos genotipos portan los genes de resistencia *golS*, *mdsA*, *mdsB* y *mdsC* que confieren resistencia a varias familias de antibióticos. En contraste, los genomas de las cepas del genotipo ST213 mostraron la presencia de los genes *mcr-1* de resistencia a colistina, *fosA3* de resistencia fosfomicina y *mphA* de resistencia a macrólidos, ausentes en ST19. Se encontraron 119 genes de virulencia en los genomas

analizados distribuidos en 11 perfiles de virulencia distintos, de los cuales ocho fueron únicos del genotipo ST19 y dos únicos del genotipo ST213. El patrón de agrupamiento con base en genes de virulencia genera subgrupos bien definidos compuestos por uno solo de los genotipos analizados, y relaciona a las cepas de humano con las aisladas de cuerpos de agua y de pollo. Los genomas de las cepas del genotipo ST213 de México presentan señal temporal y la filogenia datada obtenida sugiere que el ancestro común de dicho genotipo emergió en 1871 (95% HD1795-1930), con posterior diversificación en el país al inicio de la última década del siglo pasado. Las redes de dispersión generadas muestran que el principal elemento de dispersión del genotipo ST19 es el ser humano, mientras que para el genotipo ST213 son los alimentos de origen animal. Posteriormente, en 220 genomas del genotipo ST213 de distintas regiones del mundo recuperados de bases de datos públicas se identificó la presencia de 44 genes, 34 plásmidos y cinco mutaciones puntuales asociadas con la resistencia a los antibióticos, lo que sugiere un fenotipo de resistencia múltiple a antibióticos. El patrón de agrupamiento de acuerdo con la presencia/ausencia de genes/plásmidos que confieren resistencia a antibióticos, agrupa los genomas según el origen geográfico de la cepa. Los determinantes genéticos de la resistencia a antibióticos agrupan a los genomas de las cepas de América del Norte, sugiriendo una ruta de dispersión para llegar al Reino Unido y, de allí, al resto de Europa, luego a Asia y Oceanía. Además, la evaluación de 256 genomas de cepas globales del genotipo ST213 procedentes de distintos tipos de muestra y de distintos años de aislamiento evidenció 124 genes de virulencia con los que se pudieron generar 33 perfiles de virulencia distintos. El patrón de agrupamiento con base en genes de virulencia genera dos subgrupos, uno conformado por 79 genomas obtenidos principalmente en Europa y Asia, y otro por 176 genomas de cepas principalmente de Norteamérica. Los genomas de las cepas globales del genotipo ST213 analizadas presentan señal temporal y la filogenia datada obtenida sugiere que el ancestro común de dicho genotipo emergió en 1818 (95% HPD: 1665-1910). Se separan de manera robusta dos clados que contienen más del 90% de cepas de Eurasia y Norteamérica, los cuales divergen alrededor de 1873 (95% HPD: 1815-1927). La red de dispersión generada con relación al tipo de muestra documenta que el principal elemento de dispersión del genotipo ST213 es el ser humano, en estrecha relación con los alimentos. Con relación en el país de origen, la red de dispersión indica claramente que México fue el foco de dispersión hacia EUA y Canadá; y que de EUA y/o Canadá, el genotipo ST213 se dispersó hacia el Reino Unido, de donde se ha dispersado al resto de Europa, Asia y Oceanía. En conclusión, los resultados de filogenia datada basada en genoma núcleo y de agrupamiento basados en la presencia/ausencia de determinantes genéticos de resistencia y virulencia son coherentes. Los datos obtenidos permitieron generar hipótesis robustas sobre la historia evolutiva del genotipo ST213 y de su dinámica de dispersión, así como conocer la distribución de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos y de virulencia en cepas de distintas regiones geográficas. Esto constituye un aporte significativo al conocimiento sobre el surgimiento de patotipos emergentes de *S. enterica* y su relevancia en salud pública.

Palabras clave: Datación molecular, genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia

ABSTRACT

The species *Salmonella enterica* includes six subspecies, with the *enterica* subspecies being the main responsible for infections in animals and humans, representing a serious global public health problem. This pathogen is one of the most frequently etiological agents associated with foodborne illnesses, causing 93.8 million cases of human gastrointestinal infections per year, 150,000 of which result in death. The traditional typing of *S. enterica* subsp. *enterica* in epidemiological studies has been carried out using the Kauffmann-White-Le Minor scheme to assign strains to a specific serotype out of approximately 1547 described. The Typhimurium and its monophasic variants are among the five most prevalent serotypes worldwide, frequently isolated from human, animal, food, and environmental samples. It has been observed that some serotypes show the same antigenic formula, making necessary the use of additional techniques for strain differentiation and analysis of mechanisms associated with the emergence and spread of specific variants. Various genetic-molecular techniques have been employed for this purpose, including Multi Locus Sequence Typing (MLST), which managed to identify Sequence Type 19 (ST19) as the founder genotype for other Sequence Types (STs) within the Typhimurium serotype, being the most abundant and widely distributed genotype globally. Recently, the displacement of the ST19 genotype by the ST313 genotype in Africa and the ST34 genotype in Asia have been reported. These genotypes carry diverse genetic determinants for antibiotic resistance and virulence, making them of public health concern. Given the close clonal relationship between strains of the same genotype, evaluation of epidemiological relatedness at this level of differentiation is only possible through comparative genomic analysis. The ST213 was identified for the first time as an emerging genotype of public health relevance in Mexico, and while its presence has been reported in 13 countries, the trend of ST19 displacement by ST213 has only been documented in Mexico. The ST213 genotype strains carries the *bla*_{CMY-2} gene associated with ceftriaxone resistance and exhibits differences in stress resistance responses as compared with ST19 genotype. A substantial number of sequenced genomes of ST213 strains from Mexico and globally are currently available, enabling comparative genomic analysis to assess its public health significance. This study analyzed the genomic-epidemiological relationships of the ST213 genotype of *Salmonella* Typhimurium to establish clonal relationships among strains from different geographic regions, generate hypotheses on its emergence and possible patterns of spread, and to describe the distribution of genetic determinants of public health relevance. A total of 63 ST19 genotype genomes and 83 ST213 genotype genomes from strains isolated in Mexico were analyzed, obtained from various sample types and different years of isolation; 11 strains from the state of Michoacán, whose genomes were sequenced in this study, were included. A high percentage of strains from both genotypes carried resistance genes *golS*, *mdsA*, *mdsB*, and *mdsC*, which confer resistance to multiple antibiotic families. On the other hand, the genomes of ST213 genotype strains showed the presence of *mcr-1* genes for colistin resistance, *fosA3* for fosfomycin resistance, and *mphA* for macrolide resistance, which are absent in ST19 genomes. A total of 119 virulence genes were found in the analyzed genomes, distributed among 11 different virulence profiles, of which eight were unique to the ST19 genotype and two were unique to the ST213 genotype. The clustering pattern based on virulence genes generated well-defined subgroups composed of only one of the analyzed genotypes,

linking strains of human origin with those isolated from water bodies and chicken samples. The genomes of ST213 genotype strains from Mexico exhibit temporal signals, and the dated phylogeny suggests that the common ancestor of this genotype emerged in 1871 (95% HPD: 1795-1930), with subsequent diversification in the country at the beginning of the last decade of the twentieth century. Dispersion networks indicate that the main factor of ST19 genotype dispersion is human, while for the ST213 genotype is animal-origin foods. Subsequently, in 220 genomes of ST213 genotype strains isolated worldwide and retrieved from public databases, the presence of 44 genes, 34 plasmids, and five point mutations associated with antibiotic resistance were identified, suggesting a multiple antibiotic resistance phenotype. The clustering pattern based on the presence/absence of genes/plasmids conferring antibiotic resistance clusters genomes of the strains belong to the same geographical region. The genetic determinants of antibiotic resistance clusters the genomes of North American strains, suggesting a dispersion route to the United Kingdom and from there to the rest of Europe, then to Asia and Oceania. Furthermore, the evaluation of 256 genomes of ST213 genotype worldwide strains from different sample types and years of isolation revealed 124 virulence genes, allowing for the generation of 33 distinct virulence profiles. The clustering pattern based on virulence genes generated two subgroups, one composed of 79 genomes, mainly from Europe and Asia, and another consisting of 176 genomes of strains mainly from North America. The genomes of the analyzed global ST213 genotype strains exhibit temporal signals, and the dated phylogeny suggests that the common ancestor of this genotype emerged in 1818 (95% HPD: 1665-1910). Two robustly separated clades contain over 90% of Eurasian and North American strains, diverging around 1873 (95% HPD: 1815-1927). The dispersion network generated based on sample type showed that the main factor of ST213 genotype dispersion is human, closely related to food. With respect to the country of origin, the dispersion network clearly indicates that Mexico was the source of dispersion to the United States and Canada; and from the United States and/or Canada, the ST213 genotype dispersed to the United Kingdom, from where it has spread to the rest of Europe, Asia, and Oceania. In conclusion, the results of dated phylogeny based on the core genome and clustering based on the presence/absence of genetic determinants of resistance and virulence are coherent. The obtained data allowed for the formulation of robust hypotheses about the evolutionary history of the ST213 genotype and its dispersion dynamics, as well as insights into the distribution of genetically relevant determinants of antibiotic resistance and virulence in strains from different geographic regions. This constitutes a significant contribution to understanding the emergence of emerging *S. enterica* pathotypes and their public health relevance.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Enfermedades de transmisión alimentaria

Las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema de salud pública de relevancia a nivel mundial, ya que los alimentos contaminados pueden transmitir más de 250 patógenos, sustancias, toxinas y productos peligrosos que causan más de 200 enfermedades que van desde síntomas de corta duración (náuseas, vómitos y diarrea), hasta enfermedades prolongadas, como cáncer, insuficiencia renal o hepática, así como trastornos cerebrales y neurales (WHO, 2019). Actualmente, se ha detectado un aumento de brotes de enfermedades de transmisión alimentaria de complejidad cada vez mayor, impulsadas por la globalización del comercio de alimentos y piensos, siendo una amenaza para la salud y la economía futuras. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 600 millones de personas enferman tras ingerir alimentos contaminados y que cada año mueren 420 000 personas (WHO, 2019); adicionalmente la OMS cuantifica la pérdida de 33 millones de años de vida saludable por esta razón. Los menores de cinco años padecen el 40% de la carga de las enfermedades de transmisión alimentaria, que cada año provocan 125 000 muertes en este grupo de edad (WHO, 2019).

Por otro lado, la OMS estima que aproximadamente un tercio de las enfermedades diarreicas son transmitidas por los alimentos. Los reportes muestran que aproximadamente 1 900 millones de personas en todo el mundo se enferman de diarrea cada año y 715 000 mueren. Se cree que una mayor proporción de los casos transmitidos por alimentos son causados por el género *Salmonella*, 52% de los casos de *Salmonella* no tifoidea (NTS) y 37% de los casos de *Salmonella* tifoidea (Besser, 2018). Por otro lado, el riesgo de padecer enfermedades de transmisión alimentaria como la fiebre tifoidea y las enfermedades causadas por *Escherichia coli* patógena es mayor en los países de ingresos bajos y medianos, mientras que las causadas por *Salmonella* no tifoidea son un problema de salud pública en todas las regiones del mundo y afectan a países de ingresos bajos y altos por igual (WHO, 2019).

I.2. Género *Salmonella*

El género *Salmonella* está formado por bacilos gramnegativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. La longitud de este microorganismo oscila entre 2 a 5 μm y un diámetro de 0.7 a 1.5 μm . Son anaerobios facultativos, no forman esporas y presentan principalmente motilidad peritrica (Fàbrega y Vila, 2013). El género *Salmonella* incluye a las especies *enterica* y *bongori*. Dentro de la especie *S. enterica* hay seis subespecies, que se caracterizan tanto por un nombre como por un número romano: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). *Salmonella bongori* se clasificó originalmente como *Salmonella enterica* subespecie V, antes de ser reclasificada como una especie separada (Cheng et al., 2019). La serotipificación es el primer paso en la investigación epidemiológica de aislados clínicos y ambientales de *S. enterica* utilizada para detectar brotes, fuentes de contaminación asociada a alimentos y animales (zoonosis) y controlar las tendencias a lo largo del tiempo. Cada serotipo se define por la combinación de los lipopolisacáridos de la superficie celular (antígeno O) y una o dos proteínas flagelares diferentes (antígenos H) (Cheng et al., 2019). De acuerdo con el esquema White-Kaufmann-Le Minor, hasta la fecha se han informado 2 659 serotipos. De estos, ~1 547 serotipos pertenecen a la subespecie *enterica*, de los cuales el 99% pueden causar infecciones en animales y humanos. Muchos serotipos pueden expresar dos proteínas de flagelina diferentes, aunque una sola célula puede expresar solo una a la vez (Arai et al., 2018; De Cesare, 2018; Galanis et al., 2006; Ferrari et al., 2019; Hoffmann et al., 2020). Dentro de la subespecie *enterica*, las cepas que son patógenas para los humanos se subdividen tradicionalmente en dos grupos principales en función de su presentación clínica: *Salmonella* tifoidea o fiebre entérica y *Salmonella* no tifoidea (NTS, por sus siglas en inglés). *Salmonella* tifoidea, adaptada a los humanos, es causada por los serotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C y Sendai, mientras que el resto de los serotipos de la subespecie *enterica* se consideran NTS y, en general, son capaces de desencadenar infecciones tanto en humanos como en animales (Cuypers et al., 2018; Egorova et al., 2022; Ferrari et al., 2019).

I.3. Epidemiología de *Salmonella* no tifoidea

I.3.1. Morbilidad y mortalidad

En los países industrializados se han establecido sistemas de vigilancia epidemiológica que les permiten conocer con relativa certeza la incidencia de las infecciones por *Salmonella enterica* y otros patógenos causales de diarrea, así como el impacto de cada una de éstas en la morbilidad y mortalidad de la población (Zaidi et al., 2006).

S. enterica se encuentran entre los 31 patógenos que muestran la mayor capacidad de desencadenar enfermedades intestinales o sistémicas en humanos, y es la tercera causa principal de muerte entre las enfermedades transmitidas por alimentos (Ferrari et al., 2019). La salmonelosis humana transmitida por los alimentos causa aproximadamente 100 000 casos domésticos y 40 muertes al año en los Estados Unidos. El Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos informó un aumento en las infecciones por *Salmonella* del 17.1% entre 1997 y 2011. En la Unión Europea, la gastroenteritis por *S. enterica* fue la segunda enfermedad transmitida por alimentos notificada con mayor frecuencia por treinta países de la Unión Europea, siendo la más frecuente la gastroenteritis por *Campylobacter* (Mohammad et al., 2022). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que, en los Estados Unidos, *S. enterica* causa cada año aproximadamente 1.2 millones de infecciones, 24 000 hospitalizaciones y 450 muertes (Srednik et al., 2021). El costo económico asociado con estas infecciones y la muerte por salmonelosis se ha estimado en hasta 3 700 millones de dólares cada año debido a la pérdida de trabajo, atención médica y pérdida de calidad de vida (Aljahdali, et al., 2020). Para el caso de fiebre tifoidea, *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Paratyphi A causan millones de infecciones que resultan en miles de muertes cada año (Bawn et al., 2020), siendo *Salmonella* Typhi el serotipo de mayor relevancia, con más de 20 millones de infecciones y más de 217 000 muertes anuales (Cuypers et al., 2018; Ingle et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, las enfermedades diarreicas causan más de la mitad de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria, siendo *Salmonella* responsable del 9% de las enfermedades diarreicas que ocurren en todo el mundo anualmente y es responsable del 41% de todas las muertes asociadas a enfermedades diarreicas (Ehuwa et al., 2021). Las enfermedades diarreicas causadas por *Salmonella* no tifoidea son un problema de salud pública en la mayoría de las regiones del mundo. De acuerdo con la

OMS, en las regiones de África y Europa, *Salmonella* no tifoidea causa 32 000 y casi 2 000 muertes por año respectivamente. En las regiones de Asia Sudoriental y Mediterráneo Oriental los principales agentes mortales relacionados con enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos son norovirus, *Salmonella* no tifoidea y *Escherichia coli* patógena. Mientras que, en la región de las Américas, el 95% de los casos es provocado por cuatro agentes principales, entre ellos *Salmonella* no tifoidea (WHO, 2019).

I.3.2 Epidemiología

La epidemiología de *S. enterica* y otros agentes de enfermedades transmitidas por los alimentos ha evolucionado durante décadas debido a las amplias tendencias en la producción y el consumo de alimentos, así como la creciente industrialización y la globalización del suministro de alimentos, la demanda de alimentos “listos para comer” y alimentos crudos o ligeramente cocidos, niños pequeños mal o desnutridos, ancianos y mayor proporción de individuos inmunológicamente comprometidos, sin dejar de lado el uso de antibióticos en la producción de alimentos para animales (Tauxe et al., 2010, Newell et al., 2010, Qusted et al., 2010).

Ehuwa et al, 2021 reportan la carga mundial de salmonelosis: 20 984 683 de casos y 144 890 de muertes por *S. enterica* Typhi, 4 826 477 de casos y 33 325 de muertes por *S. enterica* Paratyphi A; 153 097 991 casos y 56 969 muertes por *S. enterica* no tifoidea. Finalmente, aunque *Salmonella* no tifoidea causa principalmente infecciones intestinales localizadas, las infecciones invasivas por NTS (iNTS) pueden ocurrir cuando las bacterias se propagan más allá de la mucosa para llegar a sitios normalmente estériles, como el torrente sanguíneo, los huesos, las articulaciones y el cerebro. La carga mundial anual de iNTS se estima en 1 131 824 de casos y 140 312 muertes por *S. enterica* no tifoidea invasiva (Cuypers et al., 2018; Ehuwa et al, 2021; Ferrari et al., 2019; Kariuki et al., 2015).

En México, *S. enterica* se puede rastrear desde 1545, y sigue siendo el patógeno transmitido por alimentos más reportado anualmente en el país, según la base de datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de México (SINAVE) (DGE, 2019). La incidencia de *Salmonella* no tifoidea (NTS) es mayor que la de *Salmonella* tifoidea, y se presenta con mayor incidencia en las regiones mexicanas de bajo nivel socioeconómico. Los casos de *Salmonella* se identifican con frecuencia en personas entre 44 y 49 años,

principalmente en mujeres, mayormente en el mes de junio (Godínez-Oviedo et al., 2020). De acuerdo con los datos de la Dirección General de Epidemiología, en 2021 se presentaron 16 217 nuevos casos de fiebre tifoidea, 5 850 casos nuevos de fiebre paratifoidea y 42 996 casos nuevos de otras salmonelosis. Sin embargo, en los apartados de las infecciones intestinales causadas por otros microorganismos y las mal definidas, se reportaron 2 825 735 de casos nuevos, dentro de los cuales podrían existir algunos casos provocados por distintos serotipos de *Salmonella enterica* (https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2021/morbilidad/enfermedad/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_mes.pdf).

Con frecuencia el médico de primer contacto hace un diagnóstico basándose en el cuadro clínico del paciente, pero sin contar con los estudios microbiológicos necesarios para establecer un diagnóstico certero. Por lo cual en México no se cuenta con estadísticas nacionales certeras de infecciones por *S. enterica*. La falta de un sistema de vigilancia con infraestructura necesaria, impide identificar las principales serovariedades de *S. enterica* en las diferentes clases de alimentos, así como evaluar el riesgo que cada una de estas representa para la salud de los humanos (Zaidi et al., 2006).

I.3.3 Distribución de serotipos

Según lo informado por los CDC de Estados Unidos, aunque todos los serotipos de *S. enterica* pueden causar enfermedades en humanos, menos de 100 serotipos representan gran parte de las infecciones (Emond-Rheault et al., 2020). La mayoría de los aislados de *Salmonella* que infectan a hospederos de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* (I), mientras que las subespecies II-VI y *S. bongori* se aíslan principalmente de fuentes ambientales o de hospederos de sangre fría, como reptiles y anfibios (Cheng et al., 2019). La distribución de los serotipos NTS está asociada regionalmente, en algunos países la proporción de casos clínicos humanos está dominada por un serotipo, mientras que otros países muestran una distribución más equilibrada de casos por serotipo.

Las diferencias regionales observadas entre la incidencia de infección por serotipos seleccionados pueden explicarse por diferencias en los hospederos animales que pueblan la región, la calidad de los sistemas de vigilancia y notificación, inmunodeficiencias concurrentes, ingesta dietética, prácticas agrícolas o prácticas de producción de alimentos o

factores ambientales que influyen en el cultivo, supervivencia o vías de transmisión. La Fig.1 muestra la distribución global de los 5 principales serotipos de NTS asociados con enfermedades clínicas en humanos notificados de 2004 a 2016 para Argentina (2007), Brasil (2007), Canadá (2007), la Unión Europea (2016), Senegal (2007), Tailandia (2004), Túnez (2007) y Estados Unidos (2016), donde se puede observar que, Typhimurium y Enteritidis se reportan como los serotipos más comunes a nivel mundial. El serotipo Enteritidis está presente en todas las regiones analizadas, ocupando el primer lugar en siete regiones, mientras que el serotipo Typhimurium se encuentra en nueve regiones, ocupando el primer lugar en Argentina, Australia y Senegal (Cheng et al., 2019).

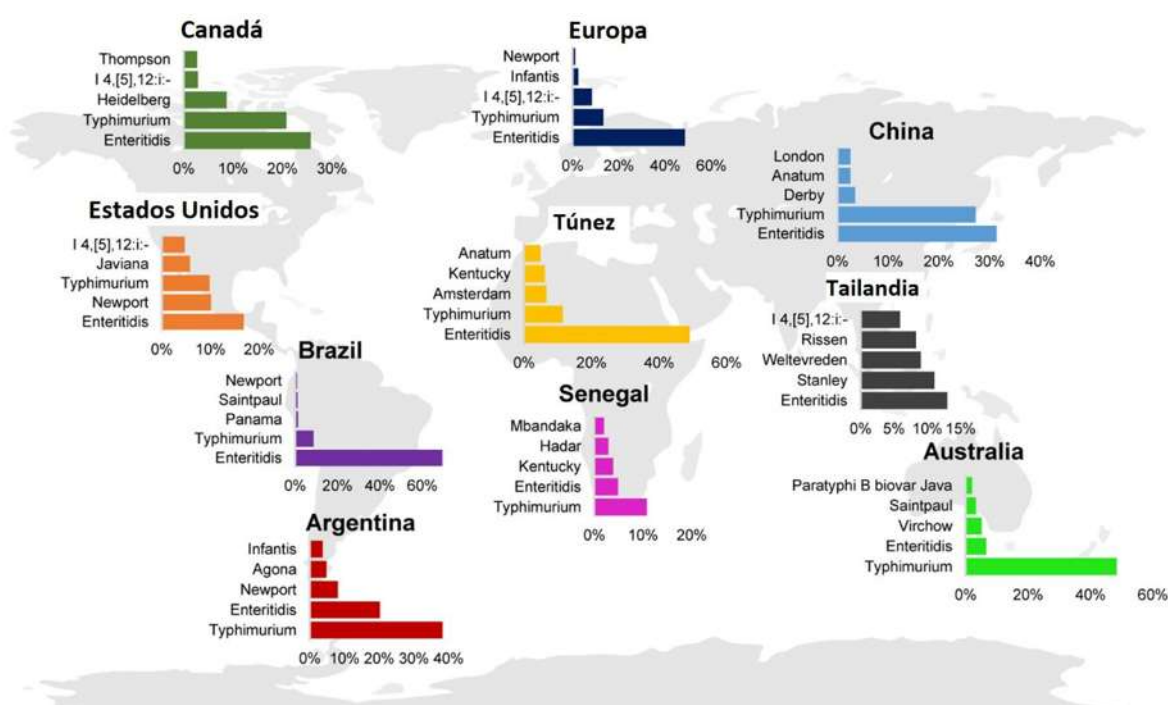


Figura 1. Distribución global de los 5 principales serotipos de NTS asociados con enfermedades clínicas en humanos notificados de 2004 a 2016 (Modificado de Cheng et al., 2019).

Por otro lado, los serotipos de NTS tienen una amplia gama de hospederos; sin embargo, algunos serotipos se detectan comúnmente en animales destinados al consumo humano, productos alimenticios y entornos agrícolas (Mohammad et al., 2022). Por ejemplo, los serotipos Infantis, Montevideo y Uganda se relacionan con aves de corral, carne de cerdo y res, de manera particular los serotipos Typhimurium, Johannesburg, Braenderup, Thompson y Montevideo están frecuentemente relacionados con el manejo de pollos (Cheng et al., 2019; Egorova et al., 2022; Hindermann et al., 2017). *Salmonella* Heidelberg, I 4,[5],12:i:-, y Hadar son serotipos comúnmente aislados de aves de corral.

Los cerdos son una de las fuentes más comunes de infecciones por *Salmonella* en humanos y se consideran el principal reservorio del serotipo Derby; sin embargo, los cerdos se han relacionado con los serotipos Meleagridis, Agona y Anatum, aunque este último es más notable en la carne de res (Cheng et al., 2019; Ferrari et al., 2019; Oladeinde et al., 2018).

Por otra parte, *Salmonella* Agona se ha asociado con varios productos alimenticios secos como leche en polvo, machacado, bocadillos secos y cereales (Cheng et al., 2019; Hoffmann et al., 2020). Otros serotipos NTS de importancia son Kentucky y Cerro, abundantes en ganado y granjas (Cheng et al., 2019; Elbediwi et al., 2021; Rodríguez-Rivera et al., 2014). Los mariscos no son un reservorio típico para *Salmonella*, aunque este microorganismo se ha aislado de pescados y mariscos con aletas y escamosos, donde el serotipo Weltevreden se encuentra con frecuencia, aunque también se ha encontrado en pollos de engorda, aves de corral y cerdos (Ferrari et al., 2019; Hounmanou et al., 2020). En relación con los alimentos de origen vegetal, los tomates se han asociado con los serotipos Montevideo, Newport, Braenderup y Javiana (Hanning et al., 2009). El serotipo Newport se encuentra en una amplia gama de hospederos y comprende tres linajes: los Linajes II y III se aíslan de mamíferos no humanos, principalmente en América del Norte, mientras que el Linaje I se aísla principalmente de humanos en Europa (Ferrari et al., 2019). Las infecciones por NTS derivadas del contacto con mamíferos se han relacionado en gran medida con los serotipos Typhimurium y Enteritidis, mientras que las zoonosis contraídas por tortugas incluyen los serotipos Sandiego y Poona. Aunque menos comunes, los serotipos no tifoideos se han aislado del suelo, el agua, los pisos contaminados, los carros y otras fuentes relacionadas con equipos. De igual manera, algunos serotipos de NTS demuestran una predilección evidente por el hospedero, tal es el caso de Dublin y Choleraesuis que prefieren ganado y cerdos, respectivamente (Ferrari et al., 2019). *Salmonella* Dublin es un serotipo adaptado al hospedero, particularmente en terneros lecheros, aunque si se han informado brotes humanos en varios países (Arai et al., 2018; Srednik et al., 2021). El serotipo Choleraesuis está adaptado a los cerdos, pero no está restringida al hospedero, pudiendo causar infecciones extraintestinales en humanos (Bawn et al., 2020; Meneguzzi et al., 2021).

Otros serotipos con especificidad de hospedador son Gallinarum y Pullorum, para aves acuáticas y aves de corral, respectivamente; así como Abortusovis y Typhisuis relacionados

con ovejas y cerdos respectivamente (Bawn et al., 2020; Ferrari et al., 2019). A pesar de lo antes mencionado, la mayoría de las investigaciones se centran en los serotipos Typhimurium y Enteritidis (Arnold et al., 2021; Egorova et al., 2022), los cuales circulan en múltiples especies de hospederos de vertebrados y causan infecciones transmitidas por los alimentos en la población humana (Arai et al., 2018; Bawn et al., 2020). Los casos de *Salmonella* Enteritidis están relacionados en gran medida con el contacto o el consumo de aves de corral o huevos, mientras que *S. Typhimurium* está presente en una amplia variedad de especies animales, por lo que es más difícil determinar el origen de los casos por este serotipo (Arnold et al., 2021). *S. Typhimurium* es el segundo serotipo más común de NTS, después de *S. Enteritidis*, aunque, según los CDC *S. Typhimurium* es el serotipo predominante que causa enfermedad en humanos (Aljahdali et al., 2020; Hammarlöf et al., 2018).

En México, los serotipos de *S. enterica* aislados con mayor frecuencia de muestras clínicas humanas recolectadas entre 1972 y 1999 fueron Typhimurium, Enteritidis, Typhi, Agona, y Newport, mientras que de 2002 a 2005 los serotipos más comunes en personas enfermas fueron Typhimurium y Enteritidis. En alimentos, las frutas y verduras de exportación han sido vinculados con brotes por los serotipos Poona, Saintpaul, Braenderup y Agona. Por otro lado, el serotipo Anatum se ha identificado en muestras de carne de res, cerdo, pollo y productos lácteos. Los serotipos GIVE, Havana e Infantis se relacionan exclusivamente con carne vacuna; Derby y Adelaide son frecuentemente aislados de productos cárnicos procesados, *Salmonella* Amsterdam en productos lácteos y el serotipo Gallinarum en pollo. Sin embargo, *Salmonella* Typhimurium es el serotipo más frecuentemente aislado de alimentos, agua (canales de riego, río, presa), en personas infectadas y enfermas durante las últimas cinco décadas. Finalmente, es importante mencionar que, a partir de agosto de 2012 el territorio mexicano fue declarado libre de salmonelosis aviar causada por *Salmonella* Gallinarum y *Salmonella* Pullorum (Godínez-Oviedo et al., 2020; Ballesteros-Nova et al., 2022).

1.3.4 *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium

Salmonella Typhimurium es el serotipo mejor estudiado para salmonelosis no tifoidea y se ha convertido en el “serotipo modelo” para estudiar NTS. La cepa LT2 de *S. Typhimurium*

se ha utilizado ampliamente desde la década de 1940 y se ha caracterizado ampliamente. Como se mencionó anteriormente, el serotipo Typhimurium presenta una distribución cosmopolita, un perfil ubicuo al encontrarse distribuido en todo el mundo, y se considera un ejemplo de serotipo “generalista”. *Salmonella* Typhimurium se ha reportado en carne de cerdo, siendo los cerdos y sus derivados el principal vehículo del serotipo en África y Asia; sin embargo, *S. Typhimurium* es el serotipo más común en aves, ganado vacuno, y sus derivados (Arai et al., 2018; Ferrari et al., 2019). *S. Typhimurium* contribuye a una morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo. Este serotipo causa gastroenteritis autolimitada, pero puede provocar bacteriemia e infecciones extraintestinales focales como meningitis, osteomielitis, aortitis, artritis séptica, especialmente en lactantes, ancianos e individuos inmunocomprometidos (Aljahdali et al., 2020; Jain et al., 2018). Las infecciones invasivas (iNTS) por *S. Typhimurium* en humanos son similares a las producidas por las formas tifoideas. También ha sido implicado en causar varios brotes de origen alimentario en adultos, así como brotes de diarrea y/o septicemia en recién nacidos y pediátricos (Ferrari et al., 2019; Jain et al., 2018).

A finales de la década de 1990, se detectaron variantes dentro del serotipo Typhimurium como *S. Typhimurium* DT104, resistente a múltiples fármacos (Rodríguez-Rivera, et al., 2014) y variantes monofásicas, con ausencia de uno o ambos antígenos flagelares, tanto en animales como en humanos. *S. Typhimurium* monofásica (MST) se detectó en el Reino Unido, pero es probable que se tratara de cepas no tipificables, en lugar de variantes monofásicas verdaderas. MST es responsable de varios brotes en Reino Unido, Luxemburgo, Alemania, Francia y los Estados Unidos. El aislamiento de MST de humanos y animales se ha vuelto común en los últimos años (Arai et al., 2018; Arnold et al., 2021; Meneguzzi et al., 2021; Rodriguez-Rivera et al., 2014). Si bien se considera que *S. Typhimurium* es un serotipo de amplia gama de hospederos, las variantes DT8, DT2 y DT56 se han identificado en poblaciones de patos, palomas y aves paseriformes, respectivamente, y rara vez en población humana (Bawn et al., 2020). *S. Typhimurium* también se ha definido por medio del análisis de tipificación de secuencias multilocus (MLST), siendo las Secuencias Tipo (ST) ST19, ST34, ST313 y ST213 las que se encuentran más comúnmente. La secuencia tipo ST19 se ha definido como el fundador y el más frecuente en todo el mundo dentro del serotipo Typhimurium; sin embargo, evidencia

reciente documenta que este genotipo ha comenzado a ser reemplazado por otros ST en algunas regiones. En China se ha documentado al genotipo ST34, junto con ST19, como el genotipo con mayor incidencia en muestras clínicas de pacientes con diarrea (Achtman et al., 2012; Sun et al., 2014; Wong et al., 2013); sin embargo, la aparición de ST34, frecuentemente vinculada con la variante monofásica también se ha informado ampliamente en Europa, América del Norte, Asia y Australia. *S. Typhimurium* ST34 monofásica circula en múltiples linajes con propiedades de resistencia a múltiples fármacos, estas variantes son consideradas un agente epidémico emergente en todo el mundo. Los cerdos son uno de los vectores más importantes de ST34 monofásica (Biswas et al., 2019; Diaconu et al., 2021).

De manera similar, ST313 ha reemplazado a ST19 como el genotipo más prevalente en África subsahariana, donde se han identificado, por medio del análisis de la secuencia del genoma completo, linajes específicos de *S. Typhimurium* ST313 que han experimentado una evolución genómica asociada con la adaptación de nicho hacia enfermedades invasivas en humanos. La ST313 ya se ha reportado en otras áreas geográficas como Brasil y México (Bawn et al., 2020; Cuyppers et al., 2018; Kariuki et al., 2015; Hammarlöf et al., 2018). En México, ST213 ha desplazado a ST19 como el genotipo de mayor incidencia en muestras clínicas y de alimentos para animales, pero la ST213 ya se ha reportado con mayor incidencia en Canadá, Estados Unidos y Reino Unido. La sustitución de ST19 por otros ST en al menos tres diferentes regiones y su rápida dispersión a nivel mundial es de relevancia epidemiológica y de salud pública, ya que se ha documentado que los ST emergentes muestran gran diversidad genotípica y fenotípica (Gómez-Baltazar et al., 2023).

I.3.5 Patogenia por *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium*

Las gastroenteritis agudas causadas por *Salmonella* no tifoidea son generalmente autolimitadas y no sanguinolentas, aunque las NTS son una causa bien conocida de heces con sangre y pueden acompañarse de síntomas sistémicos de fiebre, escalofríos, mialgias y dolor de cabeza. El vómito es un síntoma menos común. Las pruebas de heces generalmente demuestran leucocitos y, con menos frecuencia eritrocitos (Wen et al., 2017).

Salmonella no tifoidea, como *S. Typhimurium*, se adquiere con mayor frecuencia a través del consumo de agua o alimentos contaminados, aunque la transmisión de persona a persona puede contribuir a una proporción de las infecciones por NTS. *S. Typhimurium* es un patógeno que puede causar diferentes enfermedades, que van desde gastroenteritis autolimitada hasta infecciones extraintestinales como meningitis, osteomielitis, infección profunda de tejidos blandos y neumonía; puede infectar a muchos hospederos diferentes, incluidos los humanos, lo que significa que la bacteria tiene la capacidad de crecer en muchos entornos de hospederos diferentes. *S. Typhimurium* puede incluso vivir como comensal, ya que puede persistir en el intestino de los animales de granja sin causar signos de enfermedad. También se han descrito secuelas no infecciosas como la artritis reactiva (Herrero-Fresno y Olsen, 2018; Wen et al., 2017).

Después de acceder al hospedero por vía oral, *S. Typhimurium* llega al intestino grueso en donde utiliza sus flagelos y sistemas quimiotácticos para entrar en contacto con el epitelio intestinal, lo que resulta en la activación del sistema de secreción de tipo III, esencialmente una aguja proteica que inyecta una serie de proteínas efectoras en el enterocito hospedero, cuyos genes codificantes se encuentran dentro de la Isla de Patogenicidad 1 (T3SS-1). Las proteínas efectoras SopE, SopE2 y SopB liberadas por este sistema desencadenan la activación de las GTPasas de la familia Rho del hospedero, en particular RAC1, que conduce a reordenamientos del citoesqueleto de actina y macropinocitosis, dando como resultado la internalización bacteriana. Otros efectores como SipA también contribuyen al proceso de internalización. El entorno intracelular, como concentraciones bajas de magnesio y pH bajo, proporciona las señales para que *S. Typhimurium* exprese otro sistema de secreción de proteínas de tipo III codificado dentro de su isla de patogenicidad 2 (T3SS-2), para modular el tráfico de vesículas a través de las actividades de los efectores que son secretados por T3SS-2, lo que permite que el patógeno evite los mecanismos de respuesta inmune innatos y se replique dentro de las células.

La producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células infectadas inicia una cascada de eventos que conducen al reclutamiento de neutrófilos. La respuesta inflamatoria tisular altera el entorno de la luz intestinal, lo que da como resultado el agotamiento del microbiota residente y la disponibilidad de nutrientes y aceptores de electrones que alimentan la replicación de la población luminal de *S. Typhimurium*.

Después de la invasión, *S. Typhimurium* se multiplica a un ritmo bajo en el enterocito. Puede escapar de su vacuola y multiplicarse en el citosol, y las células infectadas pueden liberar T3SS1 y bacterias provocando la invasión de más células. En algunos casos, probablemente cuando las defensas del hospedero están comprometidas, *S. Typhimurium* puede diseminarse sistémicamente, lo que lleva a una infección del torrente sanguíneo y diseminación a órganos profundos como el bazo y el hígado. La infección sistémica es el resultado común cuando los seres humanos y los animales destinados al consumo humano se infectan con serotipos específicos de hospedero, como *S. Typhi*, *S. Dublin* y *S. Gallinarum*. Estos serotipos no provocan síntomas gastrointestinales primarios y parecen evitar la estimulación de la respuesta proinflamatoria. Poco después de la invasión, las bacterias se asocian con macrófagos y células dendríticas, y se cree que las bacterias se diseminan a sitios sistémicos dentro de los macrófagos. Aquí residen en una vacuola, denominada vacuola que contiene *Salmonella* (SCV) (Figura 2) (Herrero-Fresno y Olsen, 2018; Galán, 2021; Ménard et al., 2022).

I.4 Métodos para la tipificación de *Salmonella*

La serotipificación tradicional se ha utilizado durante unos 70 años en todo el mundo, siendo el método de identificación más utilizado para *Salmonella*. Dicho método ha construido durante estas décadas el primer paso en la investigación epidemiológica de aislados clínicos y ambientales del género, y ha sido crucial para la vigilancia de enfermedades transmitidas por los alimentos y la investigación de brotes. El esquema de White-Kauffmann-Le Minor es el método tradicional utilizado para la designación de los serotipos de *Salmonella*. Este enfoque se basa en el fenotipo que incluye a los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) presentes en la superficie de *Salmonella*, los cuales se detectan mediante la aglutinación de células bacterianas utilizando antisueros. Hay dos antígenos flagelares en *Salmonella*, el antígeno H de fase I (H1) y el antígeno H de fase II (H2), y los serotipos que expresan dos tipos de flagelina se denominan difásicos, mientras que aquellos con un solo tipo de antígeno flagelar se denominan monofásicos (Fàbrega y Vila, 2013; Banerji et al., 2020).

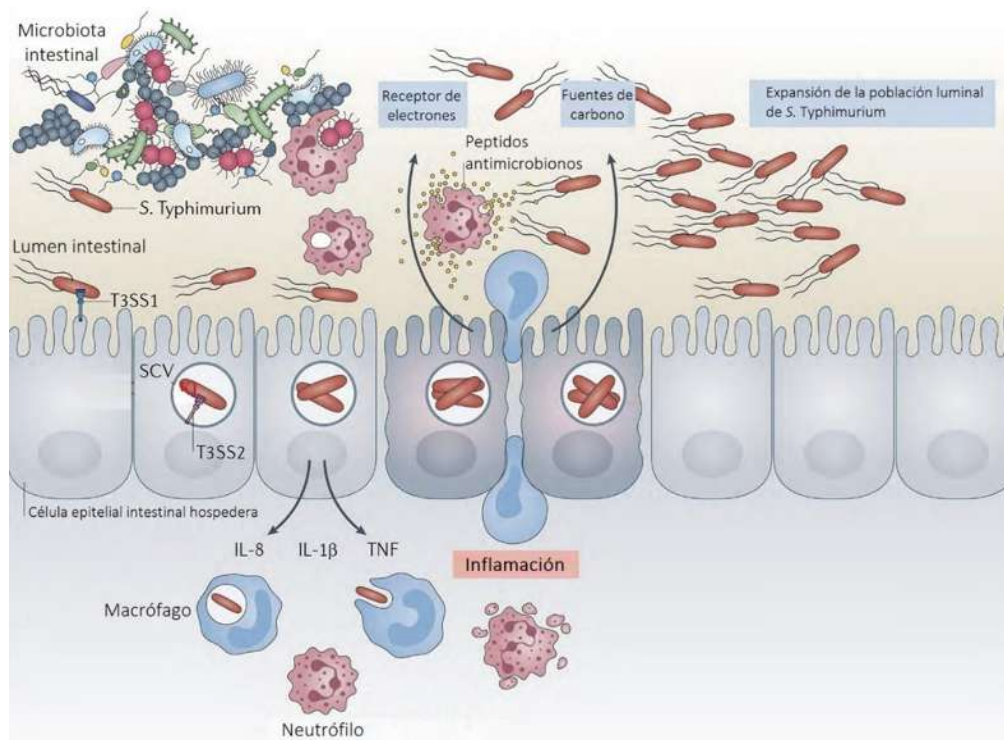


Figura 2. Modelo de interacción de *S. Typhimurium* con el epitelio intestinal (Modificado de Galán, 2021). Después de acceder al hospedero por vía oral, *S. Typhimurium* llega al intestino grueso donde entra en contacto con el epitelio intestinal, lo que resulta en la activación del sistema de secreción de tipo III-1. Las proteínas efectoras liberadas por este sistema desencadenan respuestas celulares que dan como resultado la internalización bacteriana y la producción de citocinas proinflamatorias. El entorno intracelular proporciona las señales para que *S. Typhimurium* exprese sistema de secreción tipo III-2, lo que permite que el patógeno evite los mecanismos de defensa inmune innatos y se replique dentro de las células. La producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células infectadas inicia una cascada de eventos que conducen al reclutamiento de macrófagos y neutrófilos. La respuesta inflamatoria altera el entorno de la luz intestinal, lo que da como resultado el agotamiento del microbiota residente y la disponibilidad de nutrientes y aceptores de electrones que alimentan la replicación de la población luminal de *S. Typhimurium*.

Otro esquema de clasificación tradicional, llamado tipificación de fagos, implica someter cepas de *Salmonella* a bibliotecas de fagos para determinar qué fagos son capaces de lisar una cepa determinada. Los ejemplos de tipos de fagos históricamente importantes incluyen *S. Typhimurium* DT104 y *S. Enteritidis* PT4 (Ferrarri et al., 2019); sin embargo, actualmente una gran cantidad de datos sigue generándose a nivel de serotipo. No obstante, la serotipificación tradicional tiene una serie de limitaciones que incluyen la necesidad de un laboratorio que requiere más de 250 antisueros de tipificación diferentes, así como 350 antígenos diferentes para la preparación y el control de calidad de los antisueros, para antígenos menos comunes. Para antisueros comerciales normalmente no están disponibles o son de calidad variable, se requiere un mínimo de 3 días para un solo aislado, la

serotipificación tradicional incluyen una posible pérdida de expresión de un antígeno requerido para la serotipificación. Además, la serotipificación tradicional requiere técnicos capacitados (Banerji et al., 2020).

Por todo lo anterior se desarrollaron distintos enfoques moleculares como un mayor poder de discriminación, mejor estandarización y reproducibilidad que la serotipificación tradicional de *Salmonella*. La tipificación molecular que ahora podría considerarse como “tradicional” se puede clasificar en tres categorías:

a) Métodos basados en la generación de patrones de bandas, ya sea a partir de ADN genómico o de plásmidos. Estos patrones se generan después de la digestión de restricción o de fragmentos de ADN amplificados por PCR. Entre las metodologías más conocidas está el Ribotipado y PFGE (Electroforesis en gel de campo pulsado). Entre las limitantes de estos métodos se encuentra que diferentes serotipos pueden tener patrones de bandeo idénticos o que un serotipo puede mostrar diversidad en el patrón de bandeo, por lo que podría no diferenciar correctamente aislados con un ancestro común como el serotipo Typhimurium y las variantes monofásicas o serotipos polifiléticos como Newport y Saintpaul. Adicionalmente, el tiempo de análisis puede llegar hasta las 52 h y se requiere equipo especializado con uso limitado o nulo en otras aplicaciones (Pornsukarom et al., 2018; Ktari et al., 2020).

b) Métodos basados en la secuenciación de marcadores genómicos específicos de serotipo, como la tipificación de secuencias multilocus (MLST), que clasifica los subtipos de *Salmonella* de acuerdo con los perfiles alélicos de genes “housekeeping”. Los aislados que poseen alelos idénticos para todos los fragmentos de genes se asignan a una Secuencia Tipo (ST, *Sequence Typing*) común. El esquema MLST clásico de 7 genes para aislados de *S. enterica*, incluye genes que están dispersos alrededor del cromosoma, están flanqueados por genes de función conocida, están altamente conservados y no están sujetos a presión selectiva. Los genes utilizados son *aroC* (corismato sintasa), *dnaN* (ADN polimerasa III subunidad beta), *hemD* (uroporfirinógeno III cosintasa), *hisD* (histidinol deshidrogenasa), *purE* (fosforibosil aminoimidazol carboxilasa), *sucA* (alfa cetoglutarato deshidrogenasa) y *thrA* (aspartocinasa homoserina deshidrogenasa) (Kidgell et al., 2002). Los números de alelos y secuencias tipo (ST) son asignadas de acuerdo con una base de datos MLST de acceso público (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Senterica>) que incluye los genes

seleccionados. El esquema MLST es altamente reproducible y los resultados pueden intercambiarse fácilmente entre laboratorios, además, para facilitar el análisis existen varias bases de datos de MLST de acceso público, así como herramientas/servidores de análisis en línea. Mientras que la serotipificación podría malinterpretar aislamientos no relacionados filogenéticamente como iguales, MLST distingue grupos evolutivos (Achtman et al., 2012).

c) Métodos directos que se basan en PCR o secuenciación dirigidos a los genes que codifican los antígenos somáticos (O) y flagelares (H1 y H2) o genes de virulencia, resistencia asociada a fagos y resistencia a antibióticos (Banerji et al., 2020).

I.5 Tipificación de *S. enterica* mediante secuenciación genómica

Aun cuando los métodos dirigidos a secuencias específicas son muy útiles, la secuenciación del genoma completo (WGS, *Whole Genome Sequencing*) puede ayudar a los científicos de salud pública a comprender mejor los orígenes y la dinámica de un brote, al mismo tiempo que proporciona información importante sobre las cepas del brote, como su serotipo, susceptibilidad a los antibióticos, posibles factores de virulencia y toxinas, en un único ensayo *in silico*. La epidemiología genómica bacteriana se ha convertido en una nueva e importante herramienta para los laboratorios de salud pública encargados de rastrear brotes de patógenos y la introducción de tecnologías de secuenciación masivamente paralelas, junto con la aplicación de algoritmos bioinformáticos para ensamblaje, tipificación, anotación y análisis filogenético, han comenzado a permitir el seguimiento en tiempo real de brotes, lo que facilita el control y la prevención de infecciones (Maiden et al., 2013; Shi et al., 2015; Greenman et al., 2021; Egorova et al., 2022).

Para identificar la variación en genomas completos en bacterias, el método más popular ha sido construir filogenias sobre la base de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) entre muestras que se han identificado mediante el mapeo de secuencias de lectura corta o de ensamblados completos *de novo* contra un genoma de referencia. Este enfoque se ha utilizado con éxito para investigar la epidemiología y la evolución de varios patógenos de un solo clon o miembros del mismo linaje (Maiden et al., 2013; Shi et al., 2015). Así, se ha recomendado el análisis de SNPs del genoma central del serotipo Heidelberg como un mejor enfoque para distinguir las cepas de brotes, ya que es altamente clonal y no se puede subtipificar mediante métodos convencionales como PFGE

(Oladeinde et al., 2018). Por otro lado, *S. Typhi* es genéticamente monomórfico, lo que históricamente ha limitado su vigilancia antes de la era de WGS; sin embargo, recientemente se introdujo un esquema de genotipificación filogenéticamente informativo, GenoTyphi, para facilitar la interpretación de los datos WGS de *S. Typhi*. La aplicación del esquema a una colección global de aislamientos de más de 60 países mostró que la población de *S. Typhi* está altamente estructurada y comprende docenas de subclados asociados con regiones geográficas específicas (Ingle et al., 2019). Análisis filogenéticos recientes han arrojado luz sobre el hecho de que muchos serotipos de *Salmonella* comúnmente aislados, como Newport, Montevideo, Kentucky, Paratyphi B o Derby son polifiléticos y esto puede proporcionar evidencia epidemiológica adicional para ayudar en las investigaciones de brotes al proporcionar poder discriminatorio adicional. También hay implicaciones clínicas importantes de los serotipos polifiléticos de *Salmonella* que surgen cuando diferentes clados del mismo serotipo difieren en los factores de virulencia que codifican, como es el caso del serotipo Mississippi, donde un clado codifica genes de la toxina tifoidea y el otro no (Cheng et al., 2019).

Un estudio de WGS en Dinamarca informó que, por ejemplo, SNP y análisis del pangenoma fueron superiores al método de tipificación clásico y evaluó la asociación de los aislamientos con brotes específicos de *S. Typhimurium* (Mohammad et al., 2022). El análisis de la secuencia del genoma completo de *S. Typhimurium*, aislado en varios países del África Subsahariana, ha identificado una nueva Secuencia Tipo, ST313, que es responsable de una epidemia en la región. La filogenética basada en la secuencia del genoma completo reveló el reemplazo clonal del linaje 1 de ST313 por el linaje 2 a mediados de la década de 2000, acompañado de la adquisición de resistencia al cloranfenicol. La comparación genómica entre el *S. Typhimurium* ST19 asociado a gastroenteritis clásica y los aislamientos africanos ST313 muestra que ST313 tiene un repertorio distinto de plásmidos y profagos, y transporta 77 pseudogenes que reflejan un grado de degradación del genoma. Se ha informado que el 2.7 % de *S. Typhimurium* aislado de pacientes en Inglaterra y Gales son ST313, pero carecen de los profagos característicos de los linajes africanos ST313 (Kariuki et al., 2015; Hammarlöf et al., 2018).

I.6 El reloj molecular y su relevancia epidemiológica en *Salmonella enterica*

Durante mucho tiempo el conocimiento de las escalas de tiempo evolutivas se basó únicamente en el registro fósil, pero esto cambió con el desarrollo del concepto de reloj molecular propuesto por Zuckerkandl y Pauling en la década de 1960, el cual planteó la posibilidad de inferir escalas de tiempo evolutivas utilizando datos genéticos. Actualmente, los estudios de reloj molecular se basan principalmente en datos de secuencias de ADN, ARN y proteínas. Los modelos de reloj molecular describen cómo los genomas de diferentes organismos divergen con el tiempo, postulando una relación proporcional entre la distancia genética entre dos especies y el tiempo transcurrido desde la última vez que compartieron un ancestro común. El uso del reloj molecular se ha asociado con el análisis filogenético, cuyo objetivo principal es inferir las relaciones evolutivas entre un conjunto de organismos de interés (Ho y Duchêne, 2014; Luo y Ho, 2018). En su forma original y más simple, el reloj molecular asume tasas de evolución constantes de todas las ramas de una filogenia, a lo que se le denomina *reloj estricto* y se expresa comúnmente como una relación lineal entre la distancia genética y el tiempo transcurrido desde la divergencia de los taxa o individuos que se están analizando, en donde la pendiente corresponde a la tasa evolutiva. La tasa evolutiva generalmente se expresa en sustituciones por sitio por año o sustituciones por sitio por millón de años, según el alcance temporal del análisis. En la actualidad, los modelos de reloj más utilizados son aquellos que asumen una tasa evolutiva distinta a lo largo de cada rama del árbol filogenético, conocidos como *reloj relajado*. Sin embargo, el *reloj estricto* se sigue usando como hipótesis nula cuando se prueba la variación de la tasa evolutiva. La aplicación más frecuente del reloj molecular es estimar escalas de tiempo evolutivas a partir de datos genéticos y genómicos, un procedimiento denominado *datación molecular* (Ho y Duchêne, 2014; Luo y Ho, 2018). Aunque los primeros métodos de *reloj relajado* se desarrollaron dentro de un marco de máxima verosimilitud, recientemente se implementan dentro de un marco bayesiano. Los métodos bayesianos pueden manejar modelos evolutivos complejos que de otro modo serían intratables en un marco de máxima verosimilitud. Los métodos bayesianos de *reloj relajado* estiman la velocidad a lo largo de cada rama e incluyen dos clases de modelos, los relojes auto-correlacionados los cuales asumen que las ramas vecinas comparten tasas similares, y los no correlacionados, donde no se asume ninguna correlación entre las tasas

de las ramas vecinas. En su lugar, todas las tasas específicas de la rama se muestrean a partir de una distribución elegida, como una distribución logarítmica normal, exponencial o gamma (Drummond y Rambaut, 2007; Donoghue y Yang, 2016).

El reloj molecular ha sido aplicado en el análisis epidemiológico de *S. enterica* con un enfoque evolutivo para estimar la emergencia de cepas o variantes de relevancia en salud pública. Por ejemplo, se ha observado la distribución de *S. Cerro* dentro de los Estados Unidos, identificando grupos clonales y que el clado de las cepas aisladas de bovinos procedentes de Nueva York provienen de un ancestro común datado en 1998 (Rodríguez-Rivera et al., 2014; Kovac et al., 2017) o la estructura de la población de *S. Minnesota* y *S. Heidelberg* en Brasil (Kipper et al., 2020; Kipper et al., 2021). En *Salmonella* Typhimurium se ha identificado el ancestro común más reciente para las variantes U288 y ST34 en Reino Unido alrededor del año 1937, y el ancestro común más reciente del clado epidémico U288 en 1988 (Kirkwood et al., 2021). También, se ha establecido que el ancestro común más reciente para aislados de *S. Typhimurium* DT104 surgió en 1948, en una forma susceptible a los antimicrobianos de un reservorio no identificado, mientras que el primer DT104 resistente a múltiples fármacos surgió de forma independiente en 1972 de una fuente desconocida (Leekitcharoenphon et al., 2016). El análisis de cepas de *S. Typhimurium* asociadas con humanos y bovinos del estado de Nueva York identificó a cuatro linajes representativos, dos linajes de cepas multidrogo-resistentes y dos linajes de cepas mayoritariamente susceptibles a los antibióticos. Dicho estudio estableció que los Linajes I y II surgieron en el estado de Nueva York alrededor de 1914 y 1882 respectivamente, mientras que el Linaje III probablemente surgió alrededor de 1960 y el Linaje IV alrededor de 1972 (Carroll et al., 2020). Al analizar cepas invasivas de *S. Typhimurium* ST313 del África subsahariana se identificó el surgimiento de los Linajes I y II, así como el reemplazo clonal del Linaje I por el Linaje II relacionado con el gen de resistencia *cat* entre 2003 y 2005, encontrándose además una asociación temporal de expansión clonal de *S. Typhimurium* invasiva con los picos en la prevalencia del VIH (Okoro et al., 2012).

Los estudios de reloj molecular mediante filogenias datadas también han permitido establecer dinámicas de dispersión de *S. enterica* serotipo Typhimurium entre distintos hospederos. Por ejemplo, se ha documentado que tres linajes de *S. Typhimurium* adaptadas

a aves passeriformes del Reino Unido y los Estados Unidos comparten un ancestro común alrededor de 1838. Dicho ancestro común evolucionó entre diferentes anfitriones de aves durante ~100 años, formando el linaje passeriforme de Estados Unidos en 1943, el linaje estadounidense de láridos en 1944 y el linaje de passeriformes del Reino Unido en 1965. El linaje lárido de Estados Unidos y el linaje passeriforme del Reino Unido se separaron entre sí alrededor de 1856 (Fu et al., 2022). Por otro lado, se ha estudiado un clado definido de cepas de *S. Typhimurium* asociadas a una patología renal en tortugas (*Lepidochelys olivacea*), el cual puede haberse originado tan recientemente como hace pocas décadas, unos cinco años antes que los aislamientos más antiguos del clado (Work et al., 2019). Finalmente, se determinó que *Salmonella enterica* subespecie *enterica* 4,[5],12:i:-ST34 se introdujo en los Estados Unidos desde Europa en múltiples ocasiones desde principios de la década de 2000, siendo la introducción principal en 2004 (Elnekave et al., 2020).

1.7 El pangenoma de *Salmonella enterica*

El pangenoma se define como el repertorio global de genes de una especie, o como “la colección completa de familias de genes que se encuentran en una determinada especie” (McInerney et al., 2017). El pangenoma de una especie procariota se compone de la suma del genoma núcleo (*coregenome*), que constituye el conjunto de familias de genes compartidos por todas las cepas de la misma especie, y el genoma accesorio (*accessory genome*), que es el conjunto de genes presentes en algunas, pero no en todas las cepas de la misma especie. No existe un consenso con relación a los mecanismos de evolución del pangenoma de una especie bacteriana, con argumentos tanto a favor de la evolución neutral (Andreani et al., 2017), como de la selección (McInerney et al., 2017). El debate se centra particularmente en el genoma accesorio, ya que existe evidencia de que este ha emergido como consecuencia de una extensiva transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) dentro una un tamaño de población efectivo muy grande, apoyando la neutralidad (Andreani et al., 2017). Sin embargo, también existen argumentos que indican que la evolución del genoma accesorio se encuentra moldeada por presión selectiva, que mantiene la diversidad actuando tanto sobre la pérdida de genes como sobre la ganancia de estos mediante HGT, por lo que los cambios en el contenido de genes de una especie son facilitados por y al mismo tiempo posibilitan la diferenciación de una población y la

adaptación al nicho (McInerney et al., 2017; Goyal, 2018). Un análisis reciente que analiza la co-ocurrencia de genes en el genoma accesorio de *Pseudomonas* spp. indica que la abundancia de genes en el genoma accesorio se da mediante selección, y se postula que esto puede ocurrir en especies de procariotes de pangenoma abierto como *S. enterica* (Whelan et al., 2021).

En algunos estudios, el genoma accesorio puede subdividirse en aquellos genes que están ampliamente distribuidos (*shell genes*) en una población y aquellos que son raros (*cloud/soft genes*) o únicos (Nagy et al., 2020; Whelan et al., 2021). Se considera que el genoma núcleo incluye todos los genes responsables de los aspectos básicos de la biología de una especie y sus principales rasgos fenotípicos, representando aproximadamente el 60% del pangenoma. Por el contrario, los genes accesorios contribuyen a la diversidad de especies y pueden codificar vías y funciones bioquímicas complementarias que no son esenciales para el crecimiento bacteriano pero que confieren ventajas selectivas, como la adaptación a diferentes nichos, la resistencia a los antibióticos o la colonización de un nuevo hospedero en bacterias patógenas.

Generalmente el pangenoma es considerablemente más grande que el genoma núcleo (Brockhurst et al., 2019; Innamorati et al., 2020; Aggarwal et al., 2022). El pangenoma se clasifica como "abierto" cuando con la adición de un nuevo genoma secuenciado el número de genes *recién descubiertos* aumenta. Por otro lado, el pangenoma se denomina "cerrado" si el número de *nuevos genes* descubiertos sigue siendo el mismo tras la adición de nuevos genomas (Brockhurst et al., 2019; Aggarwal et al., 2022). De manera general, el pangenoma modela el conjunto completo de elementos genómicos en una especie o clado determinado. Los análisis pangenómicos estándar se centran en la determinación de un genoma núcleo y un genoma accesorio (Eizenga et al., 2020). Los pasos generales para la construcción del pangenoma incluyen el ensamblaje del genoma de las diferentes cepas, seguido del alineamiento de los genomas y la diferenciación del genoma núcleo y el genoma accesorio. Los genes identificados se utilizan luego para la anotación funcional. Entre las aplicaciones del análisis del pangenoma está la identificación de genes nuevos, la evaluación de la capacidad de un organismo para migrar a un nicho específico, la descripción detallada de las interacciones hospedero-patógeno, facilitar la

identificación taxonómica, así como la selección de objetivos para vacunas, tratamientos y diagnósticos (Innamorati et al., 2020; Aggarwal et al., 2022).

El pangenoma de *S. enterica* muestra que el genoma núcleo de la especie tiene 2 800 genes. En cuanto al genoma accesorio, se ha determinado que está compuesto por alrededor de 19 000 genes (Jacobsen et al., 2011; Vila Nova et al., 2019). Se han construido distintos pangenomas para el serotipo Typhimurium, los cuales indican que el pangenoma del serotipo es abierto. Mientras que un estudio encuentra que el genoma núcleo está formado por 3 988 genes y el genoma accesorio consta de 7 535 genes (Carroll et al., 2020). Otro trabajo describe un genoma núcleo de 3 455 genes y un genoma accesorio de 7 713 genes (Hurtado et al., 2022). En cuanto a genotipos emergentes, el pangenoma del genotipo ST313 muestra que todos los genomas comparten 2 880 genes correspondientes al genoma núcleo y se encontraron 4 171 genes en el genoma accesorio. El análisis del pangenoma mostró que los genomas ST313 de *S. Typhimurium* estudiados presentan un pangenoma abierto (Seribelli et al., 2020).

A la fecha, no existe un pangenoma para el genotipo ST213 que ayude a revelar los patrones de evolución de virulencia, resistencia al estrés y otras características de relevancia en salud pública como la resistencia a antibióticos. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se planteó la realización de un análisis genómico comparativo de cepas de *S. Typhimurium* genotipo ST213 tanto a nivel de México, como posible centro de dispersión reciente del patógeno, como a nivel mundial, dado el incremento de reportes de dicho genotipo en las bases de datos genómicas, provenientes de distintos países en los últimos años.

I.8 Referencias bibliográficas

- Achtman, M., Wain, J., Weill, F. X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S., *S. enterica* MLST Study Group. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*. 8(6): e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>.
- Aggarwal, S. K., Singh, A., Choudhary, M., Kumar, A., Rakshit, S., Kumar, P., Bohra, A., Varshney, R. K. (2022). Pangenomics in microbial and crop research: Progress, applications, and perspectives. *Genes*, 13(4), 598. <https://doi.org/10.3390/genes13040598>.
- Aljahdali, N. H., Khajanchi, B. K., Weston, K., Deck, J., Cox, J., Singh, R., Gilbert, J., Sanad, Y. M., Han, J., Nayak, R., Foley, S. L. (2020). Genotypic and phenotypic characterization of incompatibility group FIB positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from food animal sources. *Genes*, 11(11), 1307. <https://doi.org/10.3390/genes11111307>.
- Andreani, N. A., Hesse, E., Vos, M. (2017). Prokaryote genome fluidity is dependent on effective population size. *The ISME Journal*. 11(7): 1719–1721. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.36>.
- Arai, N., Sekizuka, T., Tamamura, Y., Tanaka, K., Barco, L., Izumiya, H., Kusumoto, M., Hinenoya, A., Yamasaki, S., Iwata, T., Watanabe, A., Kuroda, M., Uchida, I., Akiba, M. (2018). Phylogenetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant isolated from food animals in Japan revealed replacement of major epidemic clones in the last 4 decades. *Journal of Clinical Microbiology*. 56:e01758–17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01758-17>.
- Arnold, M., Smith, R.P., Tang, Y., Guzinski, J., Petrovska, L. (2021). Bayesian source attribution of *Salmonella* Typhimurium isolates from human patients and farm animals in England and Wales. *Frontiers in Microbiology*. 12:579888. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.579888>.
- Ballesteros-Nova, N. E., Sánchez, S., Steffani, J. L., Sierra, L. C., Chen, Z., Ruíz-López, F. A., Bell, R. L., Reed, E. A., Balkey, M., Rubio-Lozano, M. S., Soberanis-Ramos, O., Barona-Gómez, F., Brown, E. W., Allard, M. W., Meng, J., Delgado-Suárez, E. J. (2022). Genomic epidemiology of *Salmonella enterica* circulating in surface waters used in agriculture and aquaculture in central Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 88(5): e0214921. <https://doi.org/10.1128/aem.02149-21>.
- Banerji, S., Simon, S., Tille, A., Fruth, A., Flieger, A. (2020). Genome-based *Salmonella* serotyping as the new gold standard. *Scientific Reports*. 10(1), 4333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61254-1>.
- Bawn, M., Alikhan, N. F., Thilliez, G., Kirkwood, M., Wheeler, N. E., Petrovska, L., Dallman, T. J., Adriaenssens, E. M., Hall, N., Kingsley, R. A. (2020). Evolution of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation. *PLoS Genetics*. 16(6): e1008850. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008850>.
- Besser, J. M. (2018). *Salmonella* epidemiology: a whirlwind of change. *Food Microbiology*. 71: 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>.

- Biswas, S., Li, Y., Elbediwi, M., Yue, M. (2019). Emergence and dissemination of *mcr*-carrying clinically relevant *Salmonella* Typhimurium monophasic clone ST34. *Microorganisms*. 7(9): 298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090298>.
- Brockhurst, M. A., Harrison, E., Hall, J. P. J., Richards, T., McNally, A., MacLean, C. (2019). The ecology and evolution of pangenomes. *Current biology: CB*. 29(20), R1094–R1103. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.012>.
- Carroll, L. M., Huisman, J. S., Wiedmann, M. (2020). Twentieth-century emergence of antimicrobial resistant human- and bovine-associated *Salmonella enterica* serotype Typhimurium lineages in New York State. *Scientific Reports*. 10(1), 14428. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71344-9>.
- Cheng, R. A., Eade, C. R., Wiedmann, M. (2019). Embracing diversity: differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of Nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>.
- Cuypers, W. L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E. J., Deborggraeve, S., Van Puyvelde, S. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microbial Genomics*. 4(7): e000195. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000195>.
- De Cesare A. (2018). *Salmonella* in Foods: A Reemerging Problem. *Advances in Food and Nutrition Research*. 86, 137–179. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.007>.
- Diaconu, E. L., Alba, P., Feltrin, F., Di Matteo, P., Iurescia, M., Chelli, E., Donati, V., Marani, I., Giacomini, A., Franco, A., Carfora, V. (2021). Emergence of IncHI2 plasmids with mobilized colistin resistance (*mcr*)-9 gene in ESBL-producing, multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant ST34 from food-producing animals in Italy. *Frontiers in Microbiology*. 12: 705230. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705230>.
- Donoghue, P. C., Yang, Z. (2016). The evolution of methods for establishing evolutionary timescales. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 371(1699), 20160020. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0020>.
- Drummond, A. J., Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 7, 214. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-214>.
- Egorova, A., Mikhaylova, Y., Saenko, S., Tyumentseva, M., Tyumentsev, A., Karbyshev, K., Chernyshkov, A., Manzeniuk, I., Akimkin, V., Shelenkov, A. (2022). Comparative whole-genome analysis of Russian foodborne multidrug-resistant *Salmonella* Infantis isolates. *Microorganisms*. 10: 89. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010089>.
- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, Food safety and food handling practices. *Foods (Basel, Switzerland)*. 10(5), 907. <https://doi.org/10.3390/foods10050907>.
- Eizenga, J. M., Novak, A. M., Sibbesen, J. A., Heumos, S., Ghaffaari, A., Hickey, G., Chang, X., Seaman, J. D., Rounthwaite, R., Ebler, J., Rautiainen, M., Garg, S., Paten, B., Marschall, T., Sirén, J., Garrison, E. (2020). Pangenome graphs. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 21, 139–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-120219-080406>.
- Elbediwi, M., Tang, Y., Shi, D., Ramadan, H., Xu, Y., Xu, S., Li, Y., Yue, M. (2021). Genomic investigation of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* isolates from

- dead chick embryos in China. *Frontiers in Microbiology*. 12:684400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684400>.
- Elnekave, E., Hong, S. L., Lim, S., Boxrud, D., Rovira, A., Mather, A. E., Perez, A., Alvarez, J. (2020). Transmission of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* 4,[5],12:i:- Sequence Type 34 between Europe and the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 26(12), 3034–3038. <https://doi.org/10.3201/eid2612.200336>.
- Emond-Rheault, J. G., 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, R. M., Weadge, J. T., Stephan, R., Bekal, S., Gruenheid, S., Goodridge, L. D., Levesque, R. C. (2020). The *Salmonella enterica* plasmidome as a reservoir of antibiotic resistance. *Microorganisms*. 8(7), 1016. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071016>.
- Fàbrega, A., Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2), 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
- Ferrari, R.G., Rosario, D.K.A., Cunha-Neto, A., Mano, S.B., Figueiredo, E.E.S., Conte-Junior, C.A. (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serotypes in animal-based foods: a metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 85:e00591–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>.
- Fu, Y., M'ikanatha, N. M., Lorch, J. M., Blehert, D. S., Berlowski-Zier, B., Whitehouse, C. A., Li, S., Deng, X., Smith, J. C., Shariat, N. W., Nawrocki, E. M., Dudley, E. G. (2022). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from wild birds in the United States represent distinct lineages defined by bird type. *Applied and environmental Microbiology*. 88(6), e0197921. <https://doi.org/10.1128/AEM.01979-21>.
- Galán, J. E. (2021). *Salmonella* Typhimurium and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews. Microbiology*. 19(11), 716–725. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00561-4>.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D. M., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F. J., Wegener, H. C., World Health Organization Global Salm-Surv (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerging infectious diseases*. 12(3), 381–388. <https://doi.org/10.3201/eid1205.050854>.
- Godínez-Oviedo, A., Tamplin, M. L., Bowman, J. P., Hernández-Iturriaga, M. (2020). *Salmonella enterica* in Mexico 2000-2017: Epidemiology, antimicrobial resistance, and prevalence in food. *Foodborne Pathogens and Disease*. 17(2), 98–118. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2627>.
- Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Marrufo, G., Astiazaran-Garcia, H., Ochoa-Zarzosa, A., Canett-Romero, R., García-Galaz, A., Torres-Vega, C., Vázquez-Garcidueñas, M. S. (2023). Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains isolated from food. *Microbes and Infection*. 25(1–2), 105019. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105019>.
- Goyal A. (2018). Metabolic adaptations underlying genome flexibility in prokaryotes. *PLoS Genetics*. 14(10): e1007763. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007763>.

- Greenman, N. A., Jurgensen, S. K., Holmes, C. P., 2nd, Kapsak, C. J., Davis, R. E., Maza, W. M., Edemba, D., Esser, B. A., Hise, S. M., Keen, T. N., Larson, H. G., Lockwood, D. J., Wang, B., Harsh, J. A., Herrick, J. B. (2021). Genomics of environmental *Salmonella*: Engaging students in the microbiology and bioinformatics of foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 12, 592422. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.592422>.
- Hammarlöf, D. L., Kröger, C., Owen, S. V., Canals, R., Lacharme-Lora, L., Wenner, N., Schager, A. E., Wells, T. J., Henderson, I. R., Wigley, P., Hokamp, K., Feasey, N. A., Gordon, M. A., Hinton, J. C. D. (2018). Role of a single noncoding nucleotide in the evolution of an epidemic African clade of *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 115(11), E2614–E2623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714718115>.
- Hanning, I. B., Nutt, J. D., Ricke, S. C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(6), 635–648. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0232>.
- Herrero-Fresno, A., Olsen, J. E. (2018). *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host - A mini-review. *Food Microbiology*. 71, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>.
- Hindermann, D., Gopinath, G., Chase, H., Negrete, F., Althaus, D., Zurfluh, K., Tall, B.D., Stephan, R., Nüesch-Inderbilen, M. (2017). *Salmonella enterica* serovar Infantis from food and human infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-related multidrug resistant clones and an emerging ESBL producing clonal lineage. *Frontiers in Microbiology*. 8:1322. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01322>.
- Ho, S. Y., Duchêne, S. (2014). Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular Ecology*. 23(24), 5947–5965. <https://doi.org/10.1111/mec.12953>.
- Hoffmann, M., Miller, J., Melka, D., Allard, M.W., Brown, E.W., Pettengill, J.B. (2020). Temporal dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolates from a recurrent multistate outbreak. *Frontiers in Microbiology*. 11:478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00478>.
- Hounmanou, Y.M.G., Dalsgaard, A., Sopacua, T.F., Uddin, G.M.N., Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R.S., Olsen, J.E., Larsen, M.H. (2020). Molecular characteristics and zoonotic potential of *Salmonella* Weltevreden from cultured shrimp and tilapia in Vietnam and China. *Frontiers in Microbiology*. 11:1985. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01985>.
- Hurtado, R., Barh, D., Weimer, B. C., Viana, M. V. C., Profeta, R., Sousa, T. J., Aburjaile, F. F., Quino, W., Souza, R. P., Mestanza, O., Gavilán, R. G., Azevedo, V. (2022). WGS-based lineage and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* Typhimurium isolated during 2000-2017 in Peru. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 11(9), 1170. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091170>.
- Ingle, D.J., Nair, S., Hartman, H., Ashton, P.M., Dyson, Z.A., Day, M., Freedman, J., Chattaway, M.A., Holt, K.E., Dallman, T.J. (2019). Informal genomic surveillance of regional distribution of *Salmonella* Typhi genotypes and antimicrobial resistance via returning travellers. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13(9):e0007620. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007620>.
- Innamorati, K. A., Earl, J. P., Aggarwal, S. D., Ehrlich, G. D., Hiller, N. L. (2020). The Bacterial Guide to Designing a Diversified Gene Portfolio. In H. Tettelin (Eds.) et.

- al., The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes. (pp. 51–87). Springer.
- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microbial Ecology*. 62(3), 487–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9880-1>.
- Jain, P., Sudhanthirakodi, S., Chowdhury, G., Joshi, S., Anandan, S., Ray, U., Mukhopadhyay, A., & Dutta, S. (2018). Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. *PloS One*. 13(12), e0207954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207954>.
- Kariuki, S., Okoro, C., Kiiru, J., Njoroge, S., Omuse, G., Langridge, G., Kingsley, R.A., Dougan, G., Revathi, G. (2015). Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium sequence type 313 from Kenyan patients is associated with the *bla*_{CTX-M-15} gene on a novel IncHI2 plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:3133–3139. <https://doi.org/10.1128/AAC.00078-15>.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., Achtman, M. (2002). *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(02\)00089-8](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(02)00089-8).
- Kipper, D., Carroll, L. M., Mascitti, A. K., Streck, A. F., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., Lunge, V. R. (2020). Genomic characterization of *Salmonella* Minnesota clonal lineages associated with poultry production in Brazil. *Animals: an open access journal from MDPI*. 10(11), 2043. <https://doi.org/10.3390/ani10112043>.
- Kipper, D., Orsi, R. H., Carroll, L. M., Mascitti, A. K., Streck, A. F., Fonseca, A. S. K., Ikuta, N., Tondo, E. C., Wiedmann, M., Lunge, V. R. (2021). Recent evolution and genomic profile of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from poultry flocks in Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 87(21), e0103621. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-21>.
- Kirkwood, M., Vohra, P., Bawn, M., Thilliez, G., Pye, H., Tanner, J., Chintoan-Uta, C., Branchu, P., Petrovska, L., Dallman, T., Hall, N., Stevens, M. P., Kingsley, R. A. (2021). Ecological niche adaptation of *Salmonella* Typhimurium U288 is associated with altered pathogenicity and reduced zoonotic potential. *Communications Biology*. 4(1), 498. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02013-4>.
- Kovac, J., Cummings, K. J., Rodriguez-Rivera, L. D., Carroll, L. M., Thachil, A., Wiedmann, M. (2017). Temporal genomic phylogeny reconstruction indicates a geospatial transmission path of *Salmonella* Cerro in the United States and a clade-specific loss of hydrogen sulfide production. *Frontiers in Microbiology*. 8, 737. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00737>.
- Ktari, S., Ksibi, B., Ghedira, K., Fabre, L., Bertrand, S., Maalej, S., Mnif, B., Rhimi, F., Le Hello, S., Hammami, A. (2020). Genetic diversity of clinical *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in a university hospital of south Tunisia, 2000-2013. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 85, 104436. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104436>

- Leekitcharoenphon, P., Hendriksen, R. S., Le Hello, S., Weill, F. X., Baggesen, D. L., Jun, S. R., Ussery, D. W., Lund, O., Crook, D. W., Wilson, D. J., Aarestrup, F. M. (2016). Global genomic epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(8), 2516–2526. <https://doi.org/10.1128/AEM.03821-15>.
- Luo, A., Ho, S. Y. W. (2018). The molecular clock and evolutionary timescales. *Biochemical Society Transactions*. 46(5), 1183–1190. <https://doi.org/10.1042/BST20180186>.
- Maiden, M. C., Jansen van Rensburg, M. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews. Microbiology*. 11(10), 728–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3093>.
- McInerney, J. O., McNally, A., O'connell, M. J. (2017). Why prokaryotes have pangenomes. *Nature Microbiology*. 2(4): 1-5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>.
- Ménard, S., Lacroix-Lamandé, S., Ehrhardt, K., Yan, J., Grassl, G.A., Wiedemann, A. (2022). Cross-talk between the intestinal epithelium and *Salmonella* Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*. 13:906238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.906238>.
- Meneguzzi, M., Pissetti, C., Rebelatto, R., Trachsel, J., Kuchiishi, S.S., Reis, A.T., Guedes, R.M.C., Leão, J.A., Reichen, C., Kich, J.D. (2021). Re-emergence of Salmonellosis in hog farms: outbreak and bacteriological characterization. *Microorganisms*. 9, 947. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050947>.
- Mohammad, N. S., Nazli, R., Zafar, H., Fatima, S. (2022). Effects of lipid based multiple micronutrients supplement on the birth outcome of underweight pre-eclamptic women: A randomized clinical trial. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 38(1), 219–226. <https://doi.org/10.12669/pjms.38.1.4396>.
- Nagy, T., Szmolka, A., Wilk, T., Kiss, J., Szabó, M., Pászti, J., Nagy, B., Olasz, F. (2020). Comparative genome analysis of Hungarian and global strains of *Salmonella* Infantis. *Frontiers in Microbiology*. 11, 539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00539>.
- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. (2010). Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. 139(1), S3–S15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021>.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., Kariuki, S., Msefula, C. L., Gordon, M. A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R. S., Obaro, S., Alonso, P. L., Mandomando, I., MacLennan, C. A., Tapia, M. D., Levine, M. M., Tennant, S. M., Parkhill, J., ... Dougan, G. (2012). Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature genetics*. 44(11), 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>.
- Oladeinde, A., Cook, K., Orlek, A., Zock, G., Herrington, K., Cox, N., Plumblee Lawrence, J., Hall, C. (2018). Hotspot mutations and ColE1 plasmids contribute to the fitness of *Salmonella* Heidelberg in poultry litter. *PloS One*. 13(8), e0202286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202286>.

- Pornsukarom, S., van Vliet, A. H. M., Thakur, S. (2018). Whole genome sequencing analysis of multiple *Salmonella* serovars provides insights into phylogenetic relatedness, antimicrobial resistance, and virulence markers across humans, food animals and agriculture environmental sources. *BMC genomics*. 19(1), 801. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5137-4>.
- Quested, T. E., Cook, P. E., Gorris, L. G., Cole, M. B. (2010). Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 139(1), S29–S42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.043>.
- Rodriguez-Rivera, L. D., Moreno Switt, A. I., Degoricija, L., Fang, R., Cummings, C. A., Furtado, M. R., Wiedmann, M., den Bakker, H. C. (2014). Genomic characterization of *Salmonella* Cerro ST367, an emerging *Salmonella* subtype in cattle in the United States. *BMC Genomics*. 15(1), 427. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-427>.
- Seribelli, A. A., Gonzales, J. C., de Almeida, F., Benevides, L., Cazentini Medeiros, M. I., Dos Prazeres Rodrigues, D., de C Soares, S., Allard, M. W., Falcão, J. P. (2020). Phylogenetic analysis revealed that *Salmonella* Typhimurium ST313 isolated from humans and food in Brazil presented a high genomic similarity. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 51(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00155-6>.
- Shi, C., Singh, P., Ranieri, M. L., Wiedmann, M., Moreno Switt, A. I. (2015). Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Critical Reviews in Microbiology*. 41(3), 309–325. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.837862>.
- Srednik, M.E., Lantz, K., Hicks, J.A., Morningstar-Shaw, B.R., Mackie, T.A., Schlater, L.K. (2021). Antimicrobial resistance and genomic characterization of *Salmonella* Dublin isolates in cattle from the United States. *PLoS One*. 16(9):e0249617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249617>.
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C. (2014). The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PloS One*. 9(11), e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>.
- Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmüller, T., Schlundt, J., Stein, C. E. (2010). Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International journal of food microbiology*. 139(1), S16–S28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.014>.
- Vila Nova, M., Durimel, K., La, K., Felten, A., Bessi eres, P., Mistou, M. Y., Mariadassou, M., Radomski, N. (2019). Genetic and metabolic signatures of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* associated with animal sources at the pangenomic scale. *BMC Genomics*. 20(1), 814. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6188-x>.
- Wen, S. C., Best, E., Nourse, C. (2017). Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 53(10), 936–941. <https://doi.org/10.1111/jpc.13585>.
- Whelan, F. J., Hall, R. J., McInerney, J. O. (2021). Evidence for selection in the abundant accessory gene content of a prokaryote pangenome. *Molecular Biology and Evolution*. 38(9): 3697–3708. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab139>.
- WHO. (2019). Inocuidad de los alimentos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.

- Wong, M. H., Yan, M., Chan, E. W., Liu, L. Z., Kan, B., Chen, S. (2013). Expansion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST34 clone carrying multiple resistance determinants in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 57(9), 4599–4601. <https://doi.org/10.1128/AAC.01174-13>.
- Work, T. M., Dagenais, J., Stacy, B. A., Ladner, J. T., Lorch, J. M., Balazs, G. H., Barquero-Calvo, E., Berlowski-Zier, B. M., Breeden, R., Corrales-Gómez, N., Gonzalez-Barrientos, R., Harris, H. S., Hernández-Mora, G., Herrera-Ulloa, Á., Hesami, S., Jones, T. T., Morales, J. A., Norton, T. M., Rameyer, R. A., Taylor, D. R., ... Waltzek, T. B. (2019). A novel host-adapted strain of *Salmonella* Typhimurium causes renal disease in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) in the Pacific. *Scientific Reports*. 9(1), 9313. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45752-5>.
- Zaidi, M. B., McDermott, P. F., Fedorka-Cray, P., Leon, V., Canche, C., Hubert, S. K., Abbott, J., León, M., Zhao, S., Headrick, M., Tollefson, L. (2006). Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 42(1), 21–28. <https://doi.org/10.1086/498508>.

II. JUSTIFICACIÓN

La capacidad de variación de las especies bacterianas patógenas de humano, junto con factores de salud pública asociados al manejo de enfermedades infecciosas, han contribuido a la emergencia de nuevos patógenos o variantes de patógenos de relevancia epidemiológica a nivel global. Dichos patógenos emergentes pueden ser más virulentos, presentar una mayor resistencia a los antibióticos o sobrevivir a condiciones ambientales adversas fuera del hospedero. Aún más, algunas de estas variantes de patógenos pueden presentar una combinación de dichas características.

En *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium se han detectado variantes emergentes de relevancia en salud pública, incluidos las variantes monofásicas y los genotipos ST34, ST313 y ST213. Estos patógenos emergentes se han asociado tanto a enfermedades diarreicas como a una infección sistémica, presentan resistencia múltiple a antibióticos y algunos se han dispersado a nivel global. Además, en el caso del genotipo ST313 el análisis genómico comparativo ha sido la única herramienta epidemiológica que ha permitido la detección de linajes o subpoblaciones. Esta estrategia de subtipificación mostró su relevancia epidemiológica al distinguir un linaje geográfica y temporalmente definido, resistente a antibióticos y asociado a enfermedad sistémica, de otro que no presenta dichas características.

Aunque la evidencia reportada sugiere que el genotipo ST213 surgió como patógeno emergente en México y de ahí inició su dispersión a otras regiones del mundo, se desconoce el patrón de dispersión y las características epidemiológicas de dicho genotipo a nivel global. El incremento de los reportes de genomas del genotipo ST213 en las bases de datos públicas, provenientes de distintos países de América, Europa y Asia, indican una rápida dispersión reciente, por lo que adquiere una relevancia en salud pública a nivel global.

Además de su relevancia epidemiológica y en salud pública a nivel global, el estudio de variantes genéticas emergentes como las cepas del genotipo ST213 contribuye a un mejor entendimiento de los fenómenos evolutivos relacionados con su dispersión y virulencia.

III. HIPÓTESIS

El genotipo ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium muestra un patrón de dispersión global en subgrupos epidemiológicos bien diferenciados que portan diferentes determinantes genéticos de relevancia en salud pública.

IV. OBJETIVOS

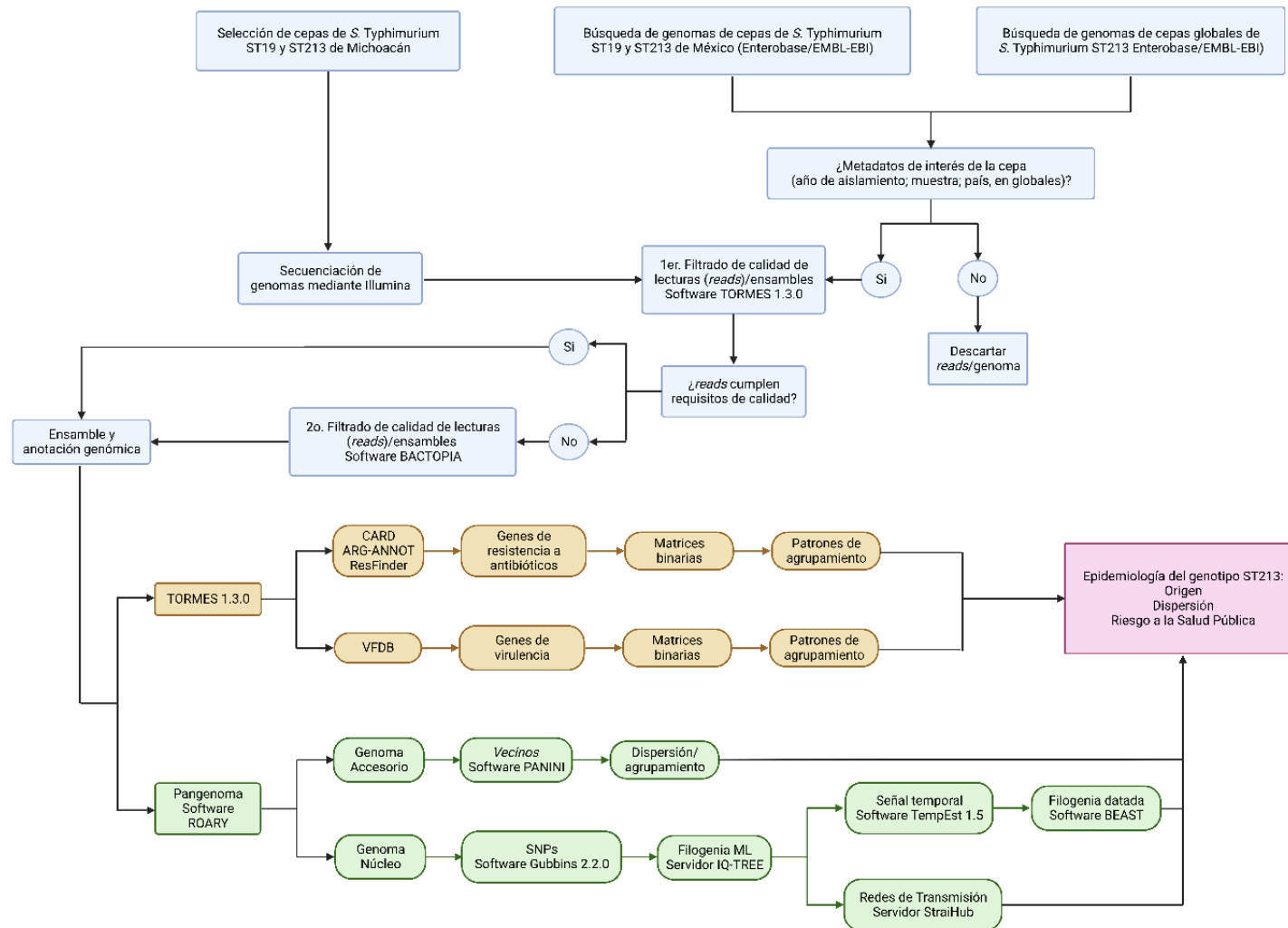
IV.1 Objetivo General

Analizar las relaciones genómico-epidemiológicas entre cepas del genotipo ST213 de *Salmonella* Typhimurium de distintas regiones geográficas para establecer posibles patrones de dispersión y de distribución de determinantes genéticos de relevancia en salud pública.

IV.2 Objetivos específicos

1. Diferenciar subgrupos epidemiológicos del genotipo ST213.
2. Establecer el patrón de distribución de los determinantes genéticos de resistencia a antibióticos y virulencia en las cepas globales del genotipo ST213.
3. Evaluar la emergencia y dispersión del genotipo ST213 en México.
4. Generar un modelo de emergencia y dispersión global del genotipo ST213.

V. ESTRATEGIA GENERAL



VI. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de este trabajo, los cuales son presentados en los siguientes tres capítulos:

CAPÍTULO I

Epidemiología genómico-molecular comparativa de los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en México.

CAPÍTULO II

Comparative Genomic Analysis Discloses Differential Distribution of Antibiotic Resistance Determinants between Worldwide Strains of the Emergent ST213 Genotype of *Salmonella* Typhimurium.

CAPÍTULO III

Análisis epidemiológico molecular global del genotipo emergente ST213 de *Salmonella* Typhimurium.

CAPÍTULO I

Epidemiología genómico-molecular de los genotipos ST19 y ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium en México

Resumen

La evidencia acumulada a la fecha sugiere que el genotipo ST213 de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium surgió en México, como una variante del genotipo fundador ST19. Se ha documentado que los genotipos emergentes de *S. enterica* a nivel global presentan resistencia múltiple a antibióticos y portan genes de virulencia que los hacen de relevancia en salud pública. Debido a la gran proximidad genética entre cepas del mismo genotipo, la evaluación de las relaciones epidemiológicas a este nivel de diferenciación solo es posible mediante el análisis genómico comparativo. No obstante que ya se cuenta con un número relevante de genomas de cepas del genotipo ST213 en México, a la fecha no se ha realizado un análisis genómico comparativo para evaluar su relevancia en salud pública, analizando los determinantes de virulencia y resistencia a antibióticos. En el presente trabajo se evaluaron 63 genomas del genotipo ST19 y 83 genomas del genotipo ST213 de cepas aisladas en México, procedentes de distintos tipos de muestra y de distintos años de aislamiento. El análisis genómico comparativo mostró que un alto porcentaje de cepas de ambos genotipos portan los genes de resistencia *golS*, *mdsA*, *mdsB* y *mdsC* asociados con la resistencia a diversas familias de antibióticos. En contraste, los genomas de las cepas del genotipo ST213 mostraron la presencia de los genes *mcr-1* de resistencia a colistina, *fosA3* de resistencia fosfomicina y *mphA* de resistencia a macrólidos, ausentes en el genotipo ST19. El patrón de agrupamiento con base en 46 genes de resistencia a antibióticos diferencia, en general a los genotipos de estudio. Se encontraron 119 genes de virulencia en los genomas analizados, con los que se pudieron generar 11 perfiles de virulencia distintos, de los cuales ocho fueron únicos del genotipo ST19 y dos únicos del genotipo ST213 y relaciona a las cepas de humano con las de bovino. El patrón de agrupamiento con base en genes de virulencia genera subgrupos bien definidos compuestos por uno solo de los genotipos analizados, y relaciona a las cepas de humano con las aisladas de cuerpos de agua y de pollo. Los genomas de las cepas del genotipo ST213 presentan señal temporal y la filogenia datada obtenida sugiere que el ancestro común de dicho genotipo emergió en 1871 (95% HD1795-1930) y este se diversificó en el país al inicio de la última década del siglo pasado. Las redes de dispersión generadas muestran que el principal elemento de dispersión del genotipo ST19 es el ser humano, mientras que para el genotipo ST213 son los alimentos de origen animal. El presente trabajo permite generar hipótesis robustas sobre la historia evolutiva del genotipo ST213 en México y diferenciar los determinantes de resistencia a antibióticos y de virulencia, así como de dispersión entre el genotipo ST19 y ST213 en el país.

Introducción

Salmonella enterica prevalece como una de las bacterias patógenas transmitidas por alimentos de mayor relevancia en salud pública a nivel global (Antunes et al., 2020), ocasionando brotes de enfermedades gastrointestinales, así como infecciones sistémicas en pacientes desnutridos o inmunocomprometidos (Marchello et al., 2022; Stanaway et al., 2019). La mayoría de los serotipos de dicho patógeno que ocasionan enfermedades en los animales y el ser humano pertenecen a *S. enterica* subsp. *enterica* (Cheng et al., 2019), siendo el serotipo Typhimurium uno de los de mayor incidencia a nivel global, generalista que infecta a diversas especies animales y se aísla de distintas matrices de alimentos (De Cesare, 2018; Ferrari et al., 2019). Este serotipo ha sido caracterizado como un agente zoonótico, que se transmite frecuentemente de distintas especies animales a humanos (Cheng et al., 2019; Ferrari et al., 2019).

El análisis genómico comparativo de *S. enterica* ha permitido la identificación de grupos clonales de relevancia en salud pública que incluyen variantes monofásicas de serotipos y genotipos particulares emergentes o re-emergentes (Makendi et al., 2016; Elnekave et al., 2018; Mather et al., 2018; Elbediwi et al., 2020). En particular, dentro del serotipo Typhimurium se ha documentado ampliamente la emergencia del genotipo de Secuencia Tipo ST313 en África Subsahariana, involucrado en infecciones sistémicas en pacientes portadores del VIH (Okoro et al., 2012; Okoro et al., 2015), del cual se han reportado variantes en Reino Unido y Brasil (Ashton et al., 2017; Panzenhagen et al., 2018). También, el genotipo ST34, reportado como emergente inicialmente en China (Sun et al., 2014) se ha encontrado posteriormente en otros países ocasionando brotes de diarrea (Biswas et al., 2019). El genotipo ST213 se reportó como una variante de relevancia en salud pública en México, aislándose tanto en pacientes enfermos como sanos, así como en muestras de alimento animal destinado al consumo humano (Wiesner et al., 2009). Se encontró un patrón temporal de reemplazo del genotipo ancestral-fundador del serotipo Typhimurium ST19 por el genotipo ST213 en cuatro estados de México entre los años 2000 y 2005. Posteriormente se documentó que cepas del genotipo ST213 carecen del plásmido de virulencia de *Salmonella* (pSTV) y portan dos grupos de plásmidos IncA/C que les confieren resistencia a múltiples antibióticos, uno de los cuales porta el gen *bla_{CMY-2}* que codifica para una beta lactamasa tipo AmpC capaz de hidrolizar cefalosporinas de

tercera generación (Wiesner et al., 2009; Wiesner et al., 2011). El genotipo ST213 ha mostrado una dispersión a Norteamérica, Europa y Asia después de su reporte inicial en México (Hernández-Díaz et al., 2022), lo que lo posiciona como una variante epidemiológicamente relevante a nivel global.

Nuestro grupo de trabajo ha explorado las diferencias genotípicas y fenotípicas entre cepas de los genotipos ST19 y ST213 con la finalidad de establecer hipótesis que permitan explicar el reemplazo de prevalencia entre dichos genotipos. Así, hemos documentado que el genotipo ST213 presenta características asociadas a la resistencia al estrés de la preservación de alimentos significativamente distintas de las del genotipo ST19, como una mayor motilidad y una mejor capacidad para formar biofilm y desarrollar células filamentosas bajo condiciones de estrés relacionadas con la conservación de alimentos (Gómez-Baltazar et al., 2019). En dichas condiciones este genotipo emergente también muestra una relación de ácidos grasos insaturados/saturados (0.5-0.6) que indica una mayor fluidez de la membrana que la del ST19. Por otro lado, las cepas ST213 muestran una mayor capacidad de internalización y mayor incremento en la secreción de interleucinas IL-8 e IL-6 por las células Caco-2 que las cepas ST19, así como un daño histopatológico característico de gastroenteritis en ratas Wistar (Gómez-Baltazar et al., 2023). Además, se ha evaluado *in silico* e *in vitro* el interactoma MreBCD de ambos genotipos, el cual está involucrado en la regulación de la patogénesis en *S. enterica*, dando como resultado patrones de interacción diferenciales involucrados en la motilidad y supervivencia de *Salmonella* en células eucariotas (Zepeda-Gurrola et al., 2021).

Todos los factores anteriores contribuyen a generar una hipótesis robusta que permita explicar el reemplazo de ST19 por ST213 en México. Sin embargo, a la fecha se desconoce el proceso de dispersión del genotipo ST213 en este país, en el que parece haber surgido como patógeno de relevancia global. En este trabajo se realizó una evaluación epidemiológica del genotipo ST213 en México empleando un análisis genómico comparativo de los genomas de dicho genotipo depositados en bases de datos públicas. Se analizan las características genómicas de relevancia en salud pública de dicho genotipo, contrastándolas con genomas de cepas del genotipo fundador ST19 también de México. Se establecen hipótesis sobre la emergencia y dispersión de genotipo ST213 en México, con base en la evidencia genómica y los metadatos asociados a los genomas analizados.

Material y Métodos

Genomas obtenidos de bases de datos

Se realizó la búsqueda en la plataforma EnteroBase de genomas de *S. Typhimurium* de los genotipos ST19 y ST213 de cepas aisladas en México, encontrándose 92 reportes para ST213 y 76 para ST19 (10 de noviembre de 2022). De estos 168 genomas reportados en EnteroBase, se descartaron 33 debido a que: (i) 10 no reportaban el año de aislamiento, y (ii) 20 no estaban disponibles genomas ensamblados o lecturas sin procesar (*reads*). Se obtuvieron 102 pares de lecturas sin procesar del sitio EMBL-EBI: EMBL's European Bioinformatics Institute y 36 genomas ensamblados (*draft genomes*) se obtuvieron directamente del sitio de EnteroBase. Los metadatos de todas las cepas ST19 cuyos genomas fueron seleccionados para su análisis se presentan en la tabla Suplementaria S1. En el caso de las cepas ST213, se muestran los metadatos de las cepas analizadas cuyos genomas no fueron incluidas en nuestro análisis previo (Hernández-Díaz et al., 2022).

Secuenciación del genoma de nuevas cepas mexicanas de S. enterica

Se obtuvo el genoma de 11 cepas de *S. enterica* aisladas entre 2008 y 2011 en el estado de Michoacán de muestras de alimentos de origen animal, principalmente res y cerdo. Estas cepas fueron amablemente proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán (LESPM) en Michoacán, México. Las cepas se seleccionaron una vez que la serotipificación por el esquema de Kauffman-White mostró su asignación al serotipo Typhimurium y la genotipificación por Multilocus Sequence Typing de siete *loci* permitió la asignación de Secuencia Tipo (ST) (Tabla 1). Se generó la secuencia del genoma completo de estas 11 cepas mediante secuenciación de extremos pareados (lecturas de 250 pb) utilizando la plataforma Illumina 1.9., a través de la empresa GENEWIZ Inc., Azenta Life Sciences Company (NJ, USA).

Tabla 1. Información de las cepas de *Salmonella enterica* cuyos genomas fueron obtenidos en el presente trabajo.

Cepa	Código LGMM	Alimento	Municipio	Año	ST
SAL004	MEXF19_2009	Queso fresco	Ciudad Hidalgo	2009	19
SAL016	MEX19F_2009	Carne de cerdo	Morelia	2009	213
SAL021	MEX21F_2009	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009	213
SAL024	MEX16F_2009	Chorizo	Lázaro Cárdenas	2009	213
SAL028	MEX15F_2009	Chorizo	Uruapan	2009	213
SAL039	MEX18F_2008	Carne de res	Apatzingán	2008	213
SAL096	MEX22F_2009	Carne de res	Zamora	2009	213
SAL109	MEX14F_2009	Carne de res	Zamora	2009	213
SAL115	MEX17F_2009	Queso asadero	Tanhuato	2009	213
SAL127	MEX20F_2008	Carne de res	La Piedad	2008	213
SAL196	MEX23F_2011	Chorizo	Pátzcuaro	2011	213

Análisis bioinformático

Para el análisis de los genomas de las cepas seleccionadas se incluyeron las 102 lecturas sin procesar obtenidas de bases de datos (EMBL-EBI), los 11 conjuntos de lecturas sin procesar de los genomas obtenidos en este trabajo y los 33 genomas ensamblados de Enterobase. El paquete TORMES 1.3.0 (Quijada et al., 2019) se utilizó para el análisis del genoma bacteriano completo y/o sus datos de secuenciación sin procesar de Illumina, empleando los filtros de calidad predeterminados. Aquellos *reads* que no pasaron los filtros de calidad de dicho paquete para su ensamblado, se procesaron con BACTOPIA (Petit y Read, 2020) para el control de calidad, ensamblaje y anotación.

Una vez obtenidos los 146 borradores de los genomas (*draft genomes*) de ambos genotipos se evaluó su calidad considerando el tamaño del genoma (~4.8-5.5 MB), el valor de N50, número de *contigs* (≤ 250 *contigs*), el tamaño promedio de *contig* y el tamaño del *contig* más largo. Como resultado de este proceso de filtrado se descartaron tres genomas de cepas ST19 debido a que el número de *contigs* superó los 250. Los datos de calidad de los genomas ensamblados y obtenidos de las bases de datos de todas las cepas ST19 se presentan en la Tabla Suplementaria S2, en el caso de las cepas ST213, se muestran los datos de calidad de las cepas cuyos genomas no fueron reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Hernández-Díaz et al., 2022).

Análisis de genes asociados a virulencia y resistencia a antibióticos

En los genomas seleccionados se identificaron genes de resistencia a antibióticos (AMR) y genes relacionados con virulencia a través de TORMES 1.3.0 con las herramientas ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014), CARD (Alcock et al., 2020) y ResFinder (Florensa et al., 2022) para la identificación de genes AMR y VFDB: Virulence Factor Database (Liu et., 2022) para genes de virulencia. Una vez identificados los diversos genes, se construyeron matrices binarias (1,0) para representar la presencia (1) /ausencia (0) de genes de resistencia o genes de virulencia, según el análisis correspondiente. Aquellos genes presentes en los genomas de todas las cepas probadas fueron excluidos del análisis. Las dos matrices fueron analizadas en el servidor ClustVis (Metsalu y Vilo, 2015) con los parámetros de Manhattan y UPGMA, para el cálculo de distancias y la generación del patrón de agrupamiento, respectivamente. Las distancias de Manhattan se calcularon con base en la presencia/ausencia de 49 genes de resistencia a antibióticos y 119 genes de virulencia. De igual forma se realizaron matrices y mapas de calor relacionando cada uno de los genes con el tipo de muestra de la cual fueron obtenidos los genomas de estudio. Para esto, los tipos de muestra agua de río (R), alimentos (F), bovino (B), cerdo (S), humano (H) y la categoría de “no determinado” (ND/Otros) incluyeron genomas de ambos genotipos durante los años 2002, 2003, 2004, 2008, 2009, 2011, 2019 y 2021; agua de presa (D) y pollo (Ch) solo genomas ST213 en los años 2005, 2007 y 2020, mientras que animal silvestre (Wa), equino (Eq) y suelo/polvo (SD) solo incluyeron genomas ST19 en 1969, 2000, 2001, 2010, 2017, 2018 y 2022.

Distribución de genoma accesorio

El cálculo del Pangenoma se realizó con Roary (Page et al., 2015) y la identificación de “vecinos” del pangenoma de los 146 *draft genomes* aislados en México a través de PANINI (Abudahab et al., 2019), utilizando aprendizaje automático basado en t-SNE. Se utilizó el servidor PANINI en el navegador y se integró con la plataforma Microreact (Argimón et al., 2016) para la visualización.

Reconstrucción filogenética y diagnóstico de señal temporal

Se usó el paquete IQ-TREE (Minh et al., 2020) para construir una filogenia de máxima verosimilitud (ML) usando el conjunto de SNPs filtrados del genoma núcleo producidos por Gubbins versión 2.2.0 para los 146 genomas de las cepas mexicanas, a partir de la alineación de SNP del genoma núcleo producido por Snippy. El modelo óptimo de evolución determinado utilizando ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) fue TVM+F+ASC+R2. Se generaron 5 000 réplicas de la prueba de relación de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira Hasegawa (SH-aLRT) de soporte de rama, y 5 000 réplicas de la prueba de arranque ultrarrápido.

Se utilizó el paquete TempEst versión 1.568 (Rambaut et al., 2016) para evaluar la estructura temporal de la filogenia resultante. Debido a la falta de evidencia de una señal temporal fuerte para la filogenia construida usando los genomas de las 146 cepas consideradas inicialmente (Coeficiente de correlación 0.2506 y $R^2 = 6.2801E^{-2}$), se procedió a construir una filogenia de máxima verosimilitud (ML) usando el conjunto de SNP filtrados producidos por Gubbins 2.2.0 para los genomas de 83 cepas ST213, una cepa ST19, dos cepas ST313 y el genoma de la cepa referencia ATCC14028 (ST19). En esta nueva reconstrucción filogenética se encontró evidencia de señal temporal (Coeficiente de correlación 0.7436 y $R^2 = 0.553$) para la construcción de la filogenia datada (Figura 1).

Construcción de redes de transmisión

Para describir de manera general las rutas de transmisión de patógenos a través de la población de *S. Typhimurium* ST213, se reconstruyó la red de transmisión con el servidor web StrainHub (<https://strainhub.io/>) (de Bernardi-Schneider et al., 2020). Se eligió la reconstrucción de ascendencia de Parsimonia y la medida de centralidad de *cercanía* (qué tan cerca está un nodo como punto directo de transmisión a otros nodos). En StrainHub se ingresó el árbol filogenético ML obtenido de IQ-Tree a partir de Gubbins y metadatos (año y hospedero) en formato de valores separados por comas (CSV) para ejecutar el paso de reconstrucción de ascendencia.

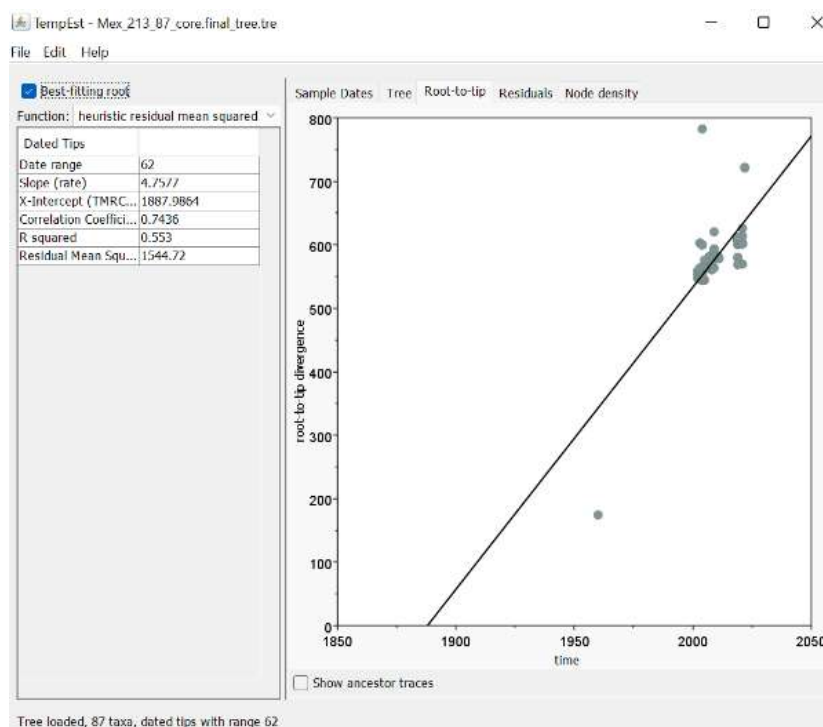


Figura 1. Análisis de la señal temporal de la filogenia ML de las cepas de *S. enterica* estudiadas. La imagen muestra el análisis de regresión. El panel muestra los valores del coeficiente de correlación y de R^2 .

Reconstrucción de la filogenia de datada

El paquete BEAST versión 1.10.4 (Suchard et al., 2018) se usó para construir una filogenia datada usando los SNPs del genoma núcleo detectados en los genomas 83 de las cepas genotipo ST213, las dos cepas ST313 y una cepa ST19 aislados en México, además del genoma de la cepa de referencia ST19 ATCC14028 de *S. Typhimurium*. Se utilizó un reloj molecular logarítmico relajado y un modelo de población *Bayesian Skyline* para tener en cuenta las tasas variables entre linajes y los posibles cambios en el tamaño efectivo de la población, respectivamente. Se utilizó una distribución logarítmica normal. Se realizaron cinco corridas independientes usando esta combinación de modelo de reloj/población, con longitudes de cadena de cien millones de generaciones, muestreando cada 10 000 generaciones.

Se empleó el paquete LogCombiner (Suchard et al., 2018) para agregar los archivos de árbol y registro resultantes producidos, mientras que mediante TreeAnnotator (Suchard et al., 2018) se generó un árbol de máxima credibilidad de clado (MCC) usando alturas de nodo de ancestro común y un 10 % de quemado. La filogenia datada se observó y editó con FigTree versión 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Resultados

De acuerdo con la información obtenida en Enterobase (consultada en febrero del 2023), México presenta un registro de 3 788 cepas del género *Salmonella* distribuido en 105 serotipos diferentes, siendo los serotipos Newport, Anatum y Typhimurium los más prevalentes. Dentro del serotipo Typhimurium se encontraron ocho genotipos diferentes por MLST clásico de siete genes *housekeeping*, mostrándose a los genotipos ST19 y ST213 con mayor presencia epidemiológica en el país, particularmente, desde el año 2000 al 2022 (Figura 2). Aunque con base únicamente en los genomas depositados, el análisis de los datos de Enterobase indica las variaciones en la prevalencia de STs en el país, particularmente en el presente siglo, con la debilidad de no ser un muestreo dirigido para analizar esto. Entre los años 2005-2007, 2012-2016 y 2020 no hubo reportes de cepas ST19 en México, mientras que, en 2006, el periodo 2012-2018 y 2022 no hubo reportes para ST213. En el periodo comprendido entre 2001 y 2007, el genotipo ST213 tuvo mayor prevalencia que el resto de los genotipos. Después de este periodo disminuyeron los reportes prácticamente a la mitad; sin embargo, hubo un repunte de todos los genotipos, principalmente de ST19 y ST213 entre 2017 y 2020.

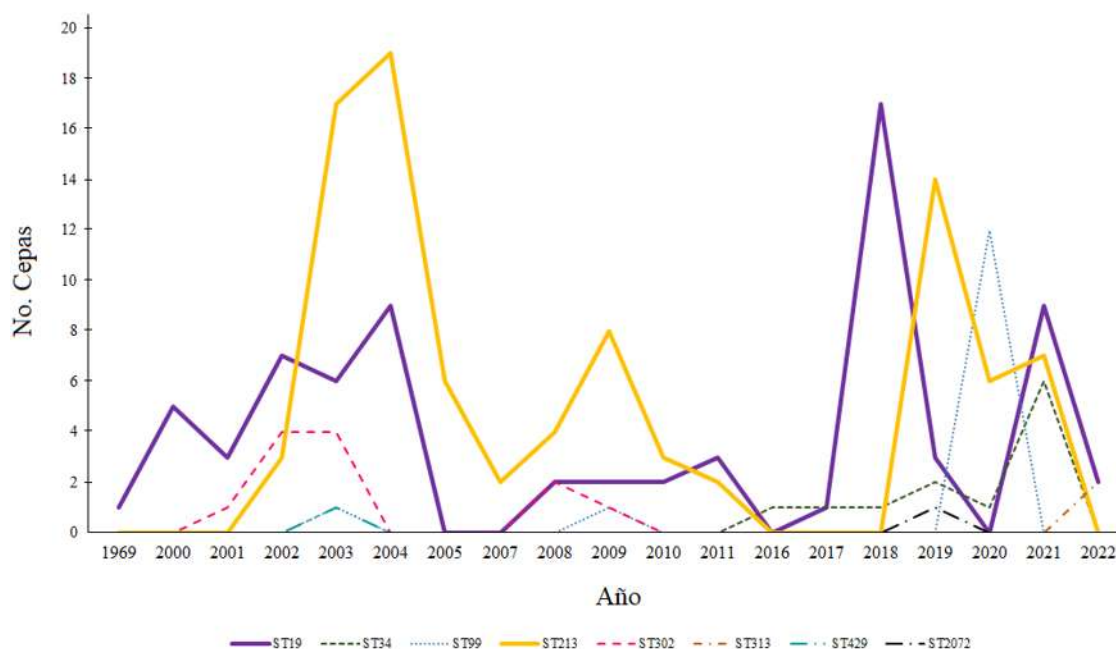


Figura 2. Genotipos de *Salmonella* Typhimurium determinados mediante Secuencia Tipo reportados en México. Distribución temporal de los genotipos de *S. Typhimurium* en México, de acuerdo con lo reportado en Enterobase al 24 de febrero de 2023 (<https://enterobase.warwick.ac.uk>).

Después de los filtrados de calidad, se recuperaron 63 genomas del genotipo ST19 y 83 del ST213 para su análisis epidemiológico y bioinformático. Para ambos genotipos se encontraron proporciones similares en la distribución de cepas por muestra (Figura 3), siendo las muestras de origen humano y ambientales aquellas de las que provienen el mayor número de cepas. Es conveniente mencionar que, aun cuando algunos genomas se registraron como pertenecientes a cepas obtenidas de alimentos o de origen animal, la mayoría de las cepas que se clasificaron como aisladas de alimentos provenían de alimentos de origen animal, en su mayoría provienen de animales para la alimentación humana. Hay genomas de cuyas cepas no se especificó el tipo de muestra de aislamiento, por lo que se registraron como “No determinado” u “Otros” (ND/Otros).

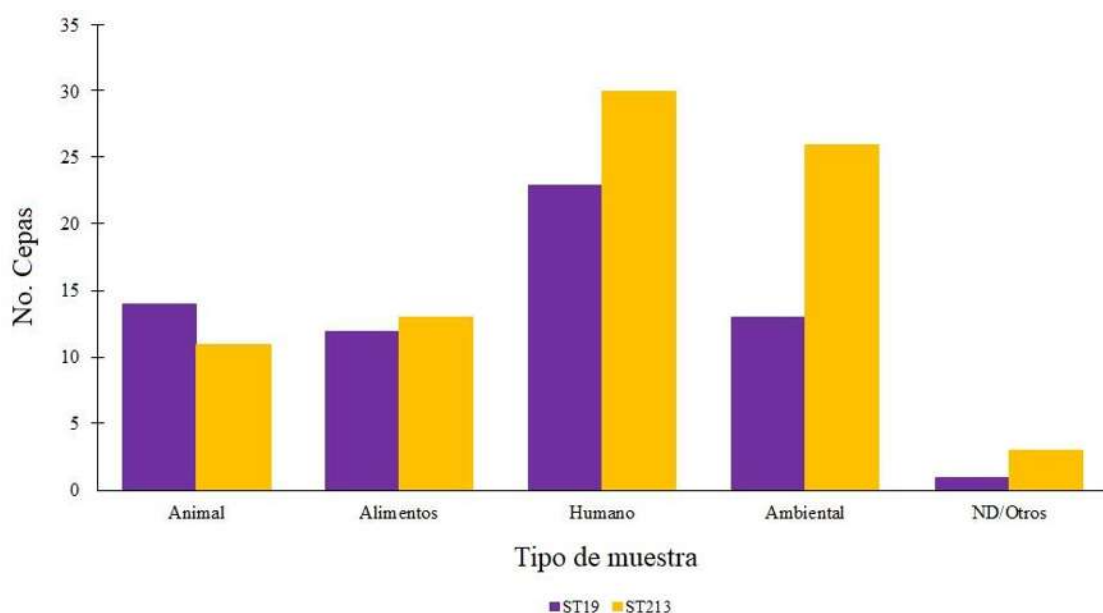


Figura 3. Distribución por tipo de muestra de las cepas de los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* aisladas en México cuyos genomas se analizaron en este trabajo. Los datos son de acuerdo con lo reportado en Enterobase al 24 de febrero de 2023 (<https://enterobase.warwick.ac.uk>).

Presencia de genes de resistencia a los antibióticos en los genomas de las cepas de genotipos ST19 y ST213 de México

Se identificaron 49 genes de resistencia a antibióticos en los genomas analizados, de los cuales 38 ya se han documentado previamente para el genotipo ST213 (Hernández-Díaz et al., 2022); los once restantes se muestran en la Tabla 2. Los genes *aac(3)-IId*, *aac(6)-Iaa*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *ant(3)-IIa*, *aph(3)-Ia*, *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *bla_{CARB-3}*, *bla_{TEM}*, *dfrA17*, *floR*, *golS*, *mdsA*, *mdsB*, *mdsC*, *mdtK*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB5*, *sdiA*, *sul1*, *sul2*, *tetA*,

tetB y *tetR* se identificaron en genomas de los genotipos ST19 y ST213. Los genes *bla_{OXA-2}*, *dfrA1*, *dfrA14*, *qnrB19*, *sat-1*, *tetC*, *tetG* y *tetR(G)* se identificaron solo en genomas de ST19, mientras que los genes *aac(3)-IV*, *aph(4)-Ia*, *bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M-14}*, *cmlA1*, *dfrA12*, *fosA3*, *linG*, *mcr-1*, *mphA*, *qacH*, *qnrA1*, *sul3* y *tetU* se encontraron únicamente en genomas de ST213.

Los genes *aac(6)-Iaa*, *mdtK* y *sdiA* estuvieron presentes en el 100% (n=146) de los genomas analizados, los genes *golS*, *mdsA*, *mdsB* y *mdsC* en el 98-99%, siete genes se encontraron entre el 50-65% de los genomas estudiados, otros siete genes se identificaron entre el 20-40% de los genomas del estudio, 19 genes se encontraron entre el 1-15% de los genomas aquí incluidos. Finalmente, los genes *aph(4)-Ia*, *bla_{OXA-2}*, *cmlA1*, *mcr-1*, *mphA*, *qnrA1*, *qnrB19*, *tetC* y *tetU* se encontraron en <1% de los genomas estudiados.

Tabla 2. Genes de resistencia a antibióticos encontrados en los genomas de cepas de genotipos ST19 y ST213 de México.

Grupo de antibiótico/ Gen de resistencia	Codificado en	Frecuencia (%)	
		ST19	ST213
Aminoglucósidos <i>aadA1</i>	Plásmidos, transposones, integrones	1.5 (n=1)	2.4 (n=2)
<i>sat-1</i>	Plásmidos	3.1 (n=2)	
β-lactámicos <i>bla_{CTX-M-14}</i> <i>bla_{OXA-2}</i>	Plásmidos, cromosoma	1.5 (n=1)	2.4 (n=2)
Colistina <i>mcr-1</i>	Plásmidos		1.2 (n=1)
Fosfomicina <i>fosA3</i>	Plásmidos, cromosoma		2.4 (n=2)
Macrólidos <i>mphA</i>	Plásmidos, cromosoma		1.2 (n=1)
Tetraciclinas <i>tetG</i> <i>tetR</i> <i>tetR(G)</i>	Plásmidos, cromosoma	26.9 (n=17) 4.7 (n=3) 26.9 (n=17)	93.9 (n=78)
Diaminopirimidinas <i>dfrA14</i>	Plásmidos, cromosoma	3.1 (n=2)	

Hasta donde se pudo documentar en el presente trabajo, este sería el primer reporte del gen *mcr-1* en el genotipo ST213 de *S. Typhimurium*. La frecuencia de cada uno de los genes se muestra detalladamente en la tabla suplementaria S3.

Varios de los genes de resistencia a antibióticos se encontraron únicamente en los genomas de cepas de genotipo ST19. Así, los genes *bla_{OXA-2}* y *tetC* solo se encontraron en

genomas de cepas procedentes de humano en 2004. Los genes *dfrA14* y *sat-1* solo se encontraron en genomas obtenidos de muestras de origen humano entre 2000-2004; *dfrA1* en muestras de alimentos y humano obtenidas en 2001-2002 y 2011. El gen *qnrB19* se identificó en un genoma de agua de río obtenido en 2021, mientras que *tetG* y *tetR(G)* se encontraron en cepas obtenidas de agua de río, bovino, cerdo y humano aisladas en 2000-2004 y 2018-2019. De aquellos genes que solo se identificaron en genomas de cepas con genotipo ST213, *aac(3)-IV* se encontró en muestras de bovino y humano obtenidas en 2003 y 2021. Los genes *aph(4)-Ia*, *cmlA1*, *mcr-1* y *mphA* se encontraron solo en un genoma obtenido de bovino en 2021. Los genes *qnrA1* y *tetU* se encontraron en un genoma cada uno, de bovino en 2004 y de humano en 2003, respectivamente; mientras que el gen *dfrA12* se identificó en todos los tipos de muestra y años en que se aislaron cepas de este genotipo, exceptuando el año 2008. Adicionalmente el gen *bla_{CMY}* también se encontró en todos los años, al igual que *qacH* y *sul3*, pero estos no se identificaron en 2007. Los genes *qacH* y *sul3* no se encontraron en cepas obtenidas de agua de presa, mientras que *bla_{CMY}* no se encontró en la categoría no especificado. El gen *linG* solo se identificó en genomas de ST213 procedentes de agua de río obtenidos en 2019 y 2021, mientras que los genes *bla_{CTX-M-14}* y *fosA3* se identificaron en genomas procedentes de agua de río y bovino en los años 2020 y 2021.

Algunos genes de resistencia a antibióticos se encontraron en genomas de cepas de ambos genotipos estudiados. Así, los genes *aac(6)-Iaa*, *golS*, *mdsA*, *mdsB*, *mdtK*, *sdiA* y *mdsC* se identificaron en todos los tipos de muestra y años incluidos en este trabajo, a excepción del último, que no se identificó en ningún genoma del 2009. En ST213, los genes *aac(3)-IId*, *aadA2*, *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *floR*, *oqxA*, *oqxB*, *sul2*, *tetA* y *tetR* se identificaron en genomas obtenidos de muestras de agua de presa, agua de río, alimentos, bovino, cerdo, humano, pollo y no especificado, exceptuando *aac(3)-IId*, *oqxA* y *oqxB* que no se identificaron en genomas provenientes de agua de presa y *floR* que no se identificó en muestras de pollo. La mayoría de los diez genes antes mencionados se encontraron en genomas obtenidos de prácticamente todos los años del periodo de aislamiento de las cepas de estudio.

Los genes *aac(3)-IId*, *aadA2*, *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *floR*, *oqxA*, *oqxB*, *sul2*, *tetA* y *tetR*, se identificaron en cepas del genotipo ST19 provenientes de muestras de cerdo,

alimentos y humano, mientras que *aadA2* y *floR* no se encontraron en muestras de alimentos, pero si en aquellas de agua de río y bovino. Por otra parte, los genes *aac(3)-IId*, *oqxA* y *oqxB* no estuvieron presente en cepas de muestras de origen humano. En genomas del genotipo ST213, los genes *aadA1*, *aadA5*, *aph(3)-Ia*, *bla_{TEM}* y *dfrA17* se identificaron en cepas de origen bovino y de alimentos, mientras que *aph(3)-Ia* y *bla_{TEM}* también se identificaron en muestras no especificadas y *bla_{TEM}* en muestras de origen humano. El gen *ant(3)-IIa* solo se identificó en muestras de agua de río, *bla_{CARB-3}* solo en muestras de bovino y *tetB* únicamente en muestras de origen humano. El gen *qnrB5* se encontró en genomas provenientes de muestras de agua, de bovino y no especificadas, mientras que *sul1* solo se encontró en muestras de origen bovino y humano. En genomas del genotipo ST19, los genes *aadA1* y *tetB* se identificaron solamente en muestras de origen humano, *ant(3)-IIa* y *qnrB5* solo en muestras de alimentos y agua de río, respectivamente. Los genes *aadA5* y *dfrA17* se identificaron en genomas provenientes de muestras de alimentos y cerdo, y *aph(3)-Ia*, *bla_{TEM}* y *sul1* tanto en muestras de alimentos como de origen humano. Adicionalmente, los genes *aph(3)-Ia* y *bla_{TEM}* también se encontraron en muestras de cerdo, mientras que *bla_{CARB-3}* se identificó en muestras de agua de río, bovino, cerdo y humano.

Los genes de resistencia a antibióticos encontrados en los genomas estudiados mostraron un patrón diferencial de presencia temporal en ambos genotipos, con genes presentes en los genomas de cepas aisladas en todo el periodo de muestreo incluido en el estudio y otros presentes solo en uno de los años del periodo. Por ejemplo, los genes *aac(3)-IId*, *aadA2*, *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *floR*, *oqxA*, *oqxB*, *sul2*, *tetA* y *tetR* no solo se caracterizaron por estar presentes en cepas aisladas de prácticamente todas las muestras incluidas, sino también porque la mayoría de ellos se encontraron en la mayoría de años del periodo de estudio. En contraste, otros genes como *aadA5* y *dfrA17* solo se encontraron en aislados del 2004, *aadA1* solo en aislados del 2001 y *ant(3)-IIa* solo en aislados del 2002.

Distribución de genes de resistencia a antibióticos por tipo de muestra

El patrón de agrupamiento por tipo de muestra elaborado con base en la presencia/ausencia de genes de resistencia en los genomas de estudio mostró dos grupos principales (Figura 4). En el primero de ellos (A) se agruparon tres tipos de muestra en los que solo se presentó el genotipo ST19, estos son suelo/polvo, animal silvestre y equino. En el otro grupo (B) se

forman tres subgrupos, en uno se agrupan los genomas obtenidos de agua de presa (ST213), pollo (ST213) y no determinados (ND/Otros), el otro agrupó los genomas provenientes de agua de río, alimentos y cerdo, mientras que el tercer grupo estuvo formado por los genomas aislados de bovino y humano (Figura 4).

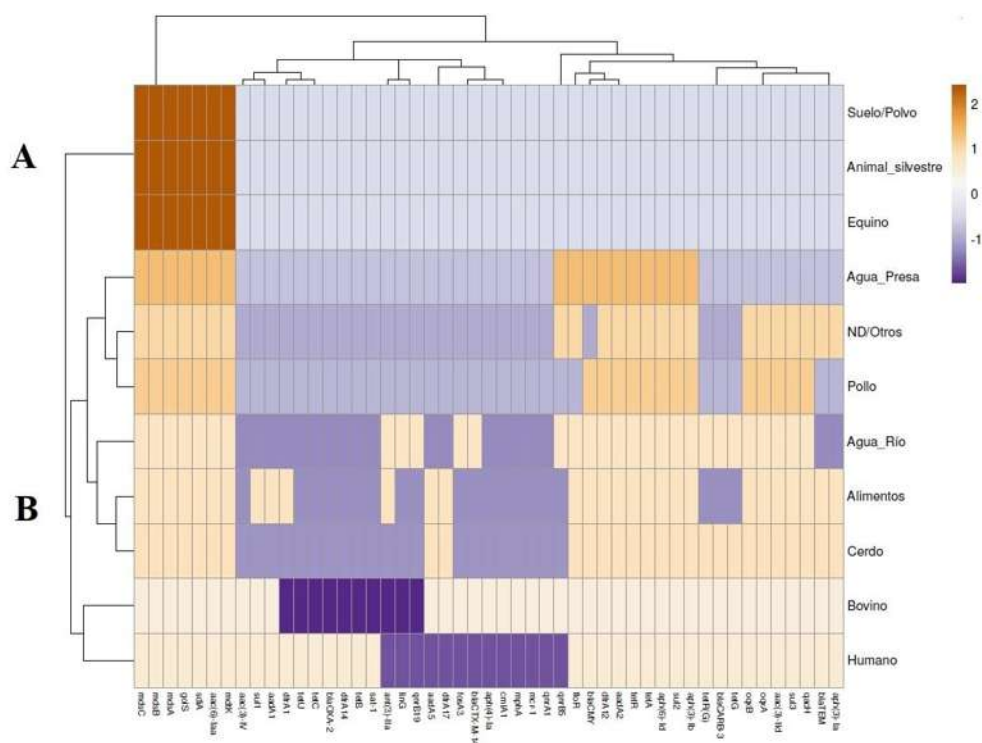


Figura 4. Patrón de agrupamiento por tipo de muestra con base en genes de resistencia a antibióticos identificados en los genomas de las cepas ST19 y ST213 analizadas en este trabajo. Se utilizó como entrada para el agrupamiento una matriz binaria de presencia (1) /ausencia (0) de cada uno de los 49 genes mostrados. Se utilizaron los criterios Manhattan y UPGMA para el cálculo de distancias y la generación del patrón de agrupamiento, respectivamente. Se resaltan los dos grupos principales.

Al generar el patrón de agrupamiento con base en la presencia/ausencia de genes de resistencia a antibióticos en los genomas de estudio considerando cada uno de los genomas analizados, también se definieron dos grupos principales. De manera interesante, el grupo A presenta únicamente genomas del genotipo ST213, mientras que en el grupo B se asociaron tanto genomas ST19 como ST213. Sin embargo, dentro del grupo B hubo subgrupos formados únicamente con genomas ST19 o ST213 (Figura 5). Cuando se generaron grupos de acuerdo con la muestra de procedencia, también se generaron dos grupos principales, pero no hubo un patrón de distribución de genes de resistencia de

corresponden a cepas aisladas antes del 2010. En el subgrupo “b” se ubicaron 21 genomas ST213, 19 obtenidos de muestras de agua en el periodo 2019-2021 y dos de bovino en 2004. En el subgrupo “c” se incluyeron seis genomas, tres ST19 y tres ST213 de diferentes tipos de muestra; cinco de los seis genomas se obtuvieron de aislados previos al año 2004. En el subgrupo “d” se conjuntaron 17 genomas ST19, seis de ellos de cepas de origen bovino aisladas en 2018 y nueve genomas de cepas provenientes de muestras humanas aisladas entre 2000-2004 (Figura 5).

La sección “e” incluyó cinco genomas, tres ST19 y dos ST213, separando al genoma MEXF19_2009 de los otros cuatro genomas en una rama independiente. El subgrupo “f” agrupó 37 genomas ST19 de cepas obtenidas de muestras de agua, alimentos, origen humano y otros cinco tipos de muestra en menor frecuencia. También contiene a dos genomas ST213 de muestras de alimentos del 2009. En este subgrupo se incluyó el genoma genotipo ST19 de la cepa más antigua de este estudio, aislada en 1969. Finalmente, en “g” se aglutinaron cuatro genomas, tres ST19 y uno ST213; dos de alimentos y dos de origen humano del año 2000 (Figura 5).

Distribución de genes relacionados con virulencia en genomas de cepas de los genotipos ST19 y ST213 aisladas en México

En este trabajo se identificaron 119 genes de virulencia en los genomas analizados. El patrón de agrupamiento con base en la presencia/ausencia de dichos genes en cada uno de los genomas estudiados formó 26 perfiles genómicos de virulencia (PGVs), de los cuales, los 11 que se encontraron en dos genomas o más se muestran en la Tabla 3, el resto de PGV se muestran en la Tabla Suplementaria S4. Ocho de los PGVs incluyeron solamente genomas del genotipo ST19, dos solo genomas ST213 y solo el PGV1 incluyó genomas de ambos genotipos. Se destacó por su frecuencia este último PGV1, en el que 65 genomas ST213 y cuatro genomas ST19 compartieron el mismo repertorio genético de virulencia que comprendió 106 genes. El PGV2 integrado únicamente por cepas del genotipo ST19 incluyó 22 genomas compartiendo 116 genes de virulencia. Los diez genes que fueron diferentes en los PGV antes mencionados son *gogB*, *grvA*, *pefA*, *pefB*, *pefC*, *pefD*, *rck*, *spvB*, *spvC* y *spvR* que solo se encontraron en genomas ST19, a excepción de *rck* que se encontró en un genoma ST213 de una cepa de origen humano del 2004. El gen *sspH1*

tampoco se encontró en genomas ST213. En consecuencia, estos 11 genes no se encontraron en cepas obtenidas de agua de presa y pollo, ni en los años 2005, 2007 y 2020, en donde solo se reportaron genomas ST213. En el caso de los genes *pefA*, *pefB*, *pefC*, *pefD*, *rck*, *spvB*, *spvC* y *spvR* no se encontraron en el genoma de cepas provenientes de muestra de suelo/polvo en 2021. Por otro lado, 108 genes de virulencia fueron identificados tanto en genomas ST19 como ST213. La frecuencia de los genes aquí identificados se muestra en la Tabla 4, destacando los 99 genes encontrados en el 100% (n=146) de los genomas incluidos en este estudio, asociados a cepas de todo tipo de muestra y de todos los años de aislamiento.

Tabla 3. Perfiles genómicos de virulencia (PGV) de los genomas ST19 y ST213 en este estudio.

PGV	Genomas	Genes ¹	ST	No. Genes
PGV1	4 65	<i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19 213	106
PGV2	22	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>rck</i> , <i>sinH</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19	116
PGV3	8	<i>entB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>rck</i> , <i>sinH</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19	115
PGV4	8	<i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>shdA</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	213	107
PGV5	7	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>rck</i> , <i>shdA</i> , <i>sinH</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19	117
PGV6	5	<i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> y <i>sseK1</i> .	213	105
PGV7	4	<i>entB</i> , <i>entE</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19	109
PGV8	2	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> y <i>sspH2</i> .	19	108
PGV9	2	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sspH1</i> y <i>sspH2</i> .	19	109
PGV10	2	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>shdA</i> , <i>sinH</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sspH1</i> y <i>sspH2</i> .	19	110
PGV11	2	<i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>rck</i> , <i>sinH</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sspH1</i> y <i>sspH2</i> .	19	117

¹**Nota.** No se muestran los 99 genes que se encontraron en el total de los genomas estudiados.

Patrones de agrupamiento con base en genes de virulencia en genomas de cepas de los genotipos ST19 y ST213 de México

Al realizar el análisis de agrupamiento con base en la matriz de presencia/ausencia de genes de virulencia en los genomas de estudio, se formaron tres grupos principales (Figura 6). Así, la cepa aislada de suelo/polvo apareció separada del resto de cepas, mientras que un grupo se conformó por los genomas obtenidos de cepas provenientes de muestras de cerdo con los genomas obtenidos de ND/Otros, equino, alimentos y animal silvestre. Finalmente,

en otro grupo se aglutinaron los genomas de cepas de origen humano con aquellas provenientes de muestras de agua y pollo (Figura 6).

Tabla 4. Frecuencia de los genes de virulencia identificados en los genomas aquí analizados.

Genes	Frecuencia (%)
<i>avrA, csgA, csgB, csgC, csgD, csgE, csgF, csgG, entA, fepC, fepG, fimC, fimD, fimF, fimH, fimI, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, lpfA, lpfB, lpfC, lpfD, lpfE, mgtB, mgtC, misL, ompA, orgA, orgB, orgC, pipB, prgH, prgI, prgJ, prgK, ratB, sicA, sicP, sifA, sifB, sipA/sspA, sipB/sspB, sipC/sspC, sipD, slrP, sodCI, sopA, sopB/sigD, sopD, sopD2, sopE2, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, spiC/ssaB, sptP, ssaC, ssaD, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaP, ssaQ, ssaR, ssaS, ssaS, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseJ, sseK2, ssel, steA, steB, steC</i>	100% (n=146)
<i>entB, mig-14, pipB2, sinH y sseI/srfH</i>	99.3% (n=145)
<i>sseK1</i>	98.7% (n=144)
<i>sspH2</i>	94.6% (n=138)
<i>grvA</i>	39% (n=58)
<i>gogB</i>	32% (n=48)
<i>rck, spvB, spvC y spvR</i>	31% (n=46)
<i>pefB, pefC, pefD y pefA</i>	30% (n=44)
<i>shdA</i>	14.4% (n=21)
<i>entE y sspH1</i>	4.8% (n=7)

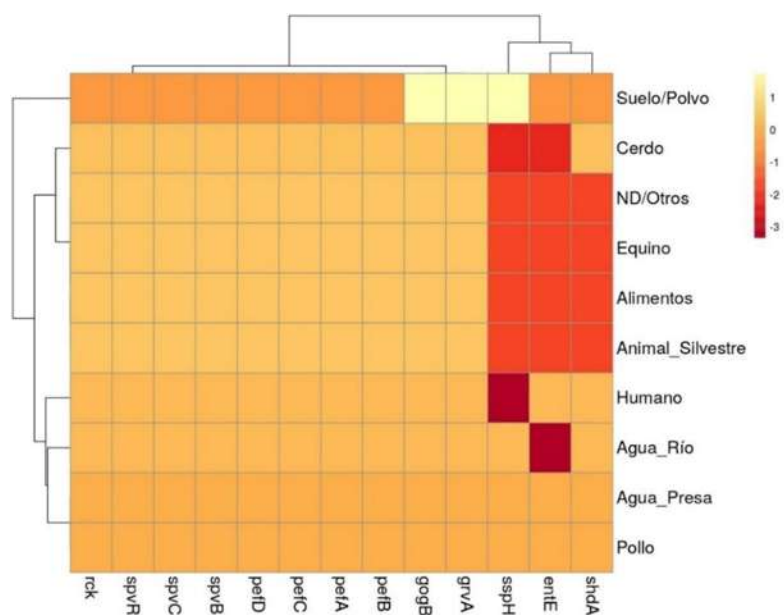


Figura 6. Patrón de agrupamiento de los genomas de las cepas ST19 y ST213 con base en la distribución de genes de virulencia. Se utilizó como entrada para el agrupamiento una matriz binaria de presencia (1) /ausencia (0) de cada gen mostrado utilizando Manhattan y UPGMA para el cálculo de distancias y la generación del patrón de agrupamiento, respectivamente. Se excluyeron los genes y tipo de muestra presentes en todos los genomas estudiados.

Por otro lado, el patrón de agrupamiento generado cuando la información sobre la presencia/ausencia de genes de virulencia se asoció con los genomas analizados, muestra cinco agrupamientos. En el grupo “a” se ubicaron 16 genomas del genotipo ST19 de cepas de origen bovino, porcino, humano y agua de río; en “b” se agruparon 28 genomas ST19 de cepas provenientes de ocho diferentes tipos de muestra; en “c” se aglutinaron 11 genomas ST213 de cepas de origen bovino, humano y de agua de río, la mayoría de aislados anteriores a 2007. En el grupo “d” se incluyeron 75 genomas ST213 y dos genomas ST19 del 2004, uno de cepas obtenida de alimentos y uno de cepa proveniente de muestra de cerdo. Finalmente, en “e” se agruparon 14 genomas ST19, diez de los cuales se obtuvieron en los años 2000 y 2004 (Figura 7).

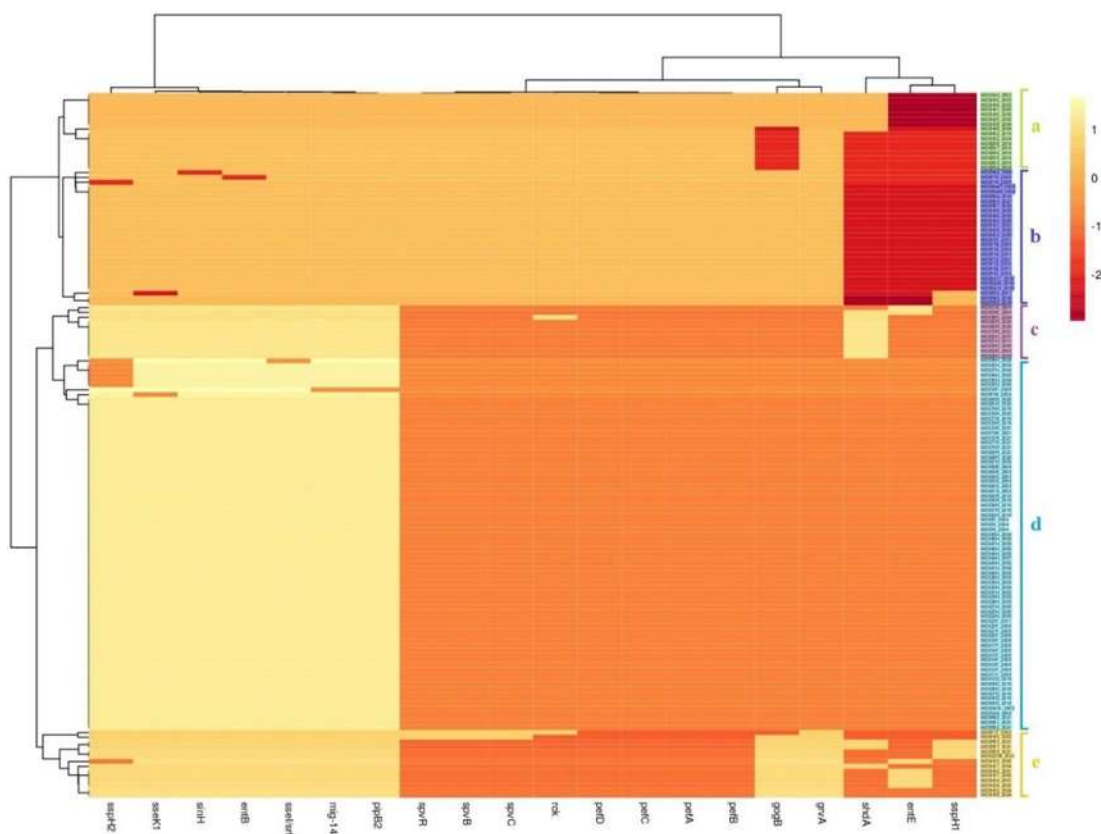


Figura 7. Patrón de agrupación de los genes de virulencia identificados en los genomas de las cepas ST19 y ST213. Se utilizó como entrada para el agrupamiento una matriz binaria de presencia (1) /ausencia (0) de cada gen mostrado utilizando Manhattan y UPGMA para el cálculo de distancias y la generación del patrón de agrupamiento, respectivamente. Se excluyeron los genes que estuvieron presentes en todos los genomas analizados en este trabajo. Ver texto para detalles de la descripción de los subgrupos indicados.

Agrupamiento por genoma accesorio

En lo que se refiere a la relación de las cepas de acuerdo con el contenido del genoma accesorio, se muestra una clara separación entre los genomas ST19 y ST213, a excepción de cinco genomas ST19, MEXR51_2021, MEXR52_2021, MEXR60_2021, MEXS44_2004 y MEXF54_2004 que son vecinos cercanos de los genomas ST213. Por otro lado, a excepción de estas cinco cepas, las cepas del genotipo ST19 forman un grupo compacto, con una dispersión restringida, mientras que para el caso del genotipo ST213 se observa una dispersión más pronunciada entre las cepas (Figura 8).

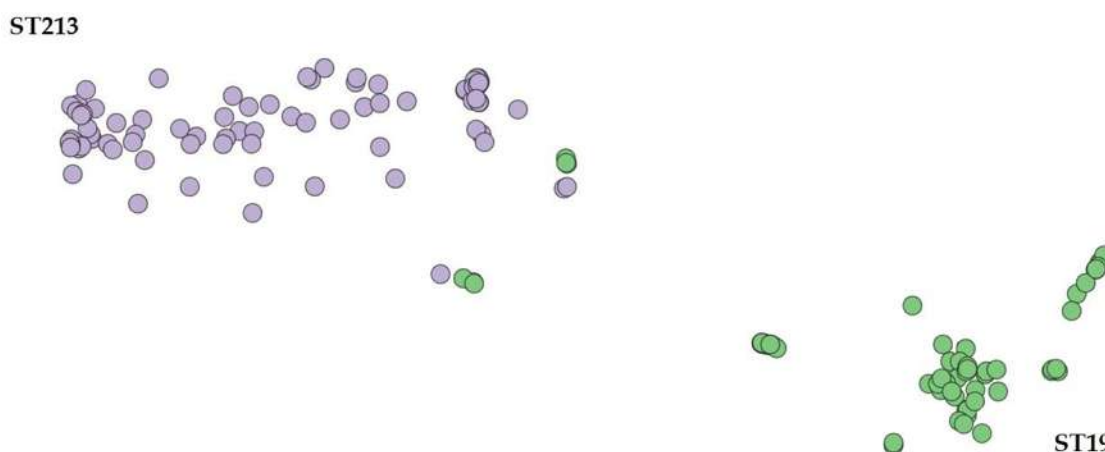


Figura 8. Representación gráfica de cercanía de acuerdo con el genoma accesorio de los genomas ST19 y ST213 analizados en este trabajo. Se muestra una separación entre los genomas de los genotipos ST19 y ST213, a excepción de cinco individuos ST19. Ver texto para detalles.

Dinámica de propagación de los genotipos ST19 y ST213 en México

La dinámica de propagación elaborada para las cepas de ambos genotipos de manera conjunta muestra que el ser humano es la principal fuente de transmisión de *S. Typhimurium* en México, presentándose como el centro de la cadena de transmisión (Figura 9A). El ser humano dispersa las cepas directamente a la mayoría de los ambientes/hospederos representados en la muestra, particularmente hacia los alimentos de origen animal y a ganado bovino. A partir de la contaminación de alimentos, se observa una intensa contaminación de dicha fuente de regreso al humano y a cuerpos de agua (Figura 9A).

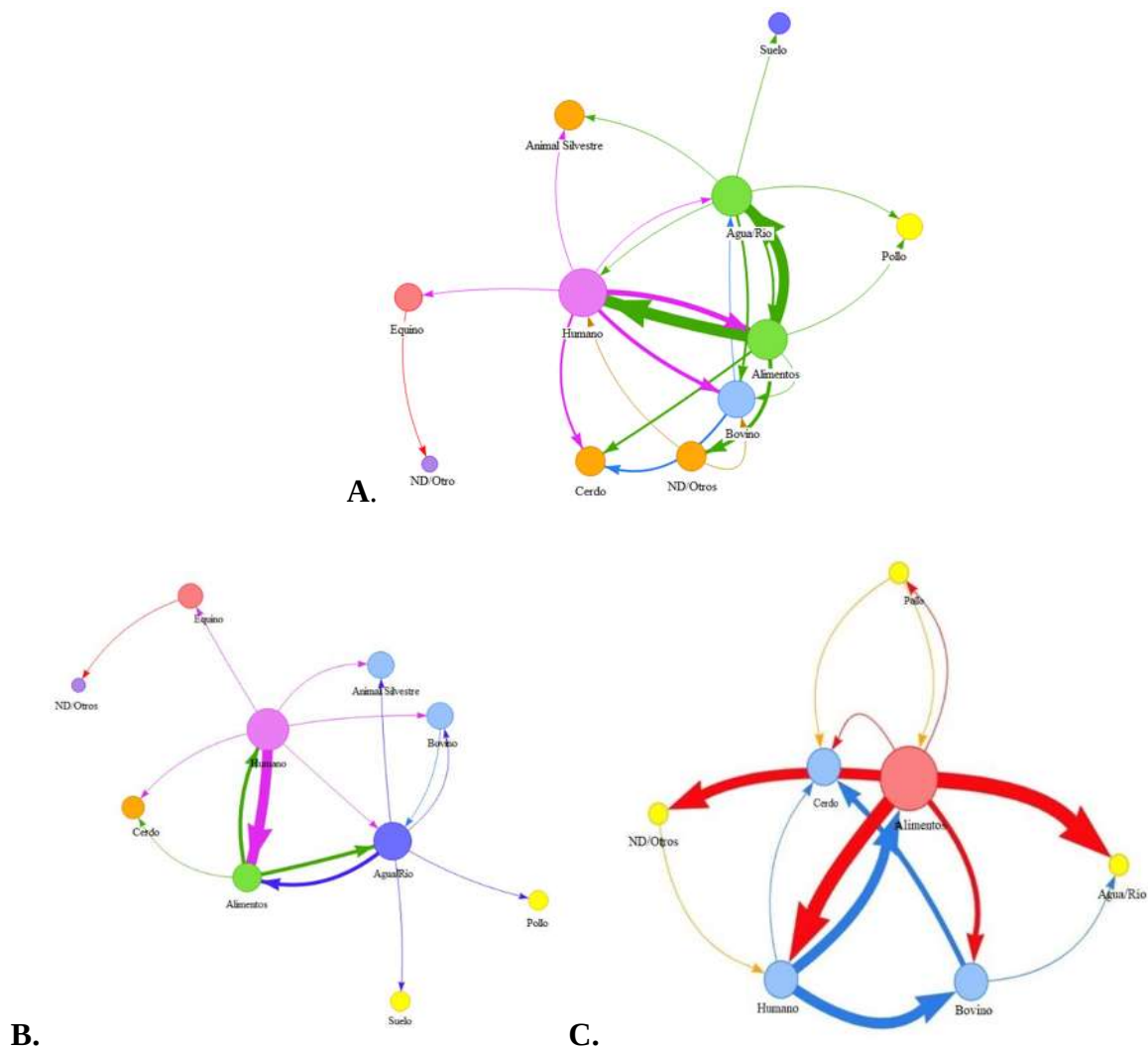


Figura 9. Redes de transmisión de *Salmonella* Typhimurium y los genotipos ST19 y ST213 en México. Se muestran las redes de transmisión del serotipo Typhimurium (panel A), del genotipo ST19 (panel B) y del genotipo ST213 (panel C). El tamaño de los nodos (círculos) se escala según la métrica de cercanía. Las flechas reflejan la direccionalidad de la transición entre tipos de muestra. El grosor de las flechas representa la frecuencia de las transiciones (las flechas más gruesas reflejan más transiciones).

Cuando la dinámica de propagación se elabora independientemente para cepas/genomas de cada genotipo, se encuentra que para el genotipo ST19 nuevamente el ser humano es la principal fuente de transmisión en México, con una marcada propagación de unidireccional hacia el resto de los ambientes/hospederos (Figura 9B). También en este caso el principal intercambio bidireccional es humano-alimentos y de alimentos hacia el agua, pero este último ambiente no parece participar en la contaminación directa de otros hospederos, como en el caso del serotipo Typhimurium, sin distinción de genotipos. En contraste, para las cepas del genotipo ST213, los alimentos aparecen como principal fuente

de transmisión. Se observa aquí una dispersión unidireccional prácticamente hacia el resto de los ambientes/hospederos. Al igual que en los otros dos casos, el principal intercambio recíproco ocurre con el ser humano y los alimentos (Figura 9C).

Análisis filogenómico de las cepas de genotipo ST19 y ST213 de México

A partir del alineamiento del genoma núcleo se obtuvo una filogenia mediante el criterio de Máxima Verosimilitud (ML), en la cual se observaron dos clados bien definidos (Figura 10). en uno de los cuales se agrupan en diversas ramificaciones los genomas pertenecientes al genotipo ST19. Sin embargo, un subclado que incluye a cinco genomas ST19 aparecen estrechamente relacionados al clado principal de las cepas de genotipo ST213. De estas cinco cepas ST19, dos se aislaron en 2004 a partir de muestras de alimentos y cerdo, mientras que los otros tres genomas pertenecen a cepas aisladas en 2021 a partir de muestras de agua. De manera interesante, estos cinco genomas pertenecen a las cepas que aparecen relacionadas con las cepas ST213 en el análisis de agrupamiento por genomas accesorio anteriormente mostrado. En el clado que contiene la totalidad de genomas de cepas del genotipo ST213, el genoma MEX36H_2003 es el que se separa primero del resto de genomas ST213 en una rama independiente (Figura 10).

Filogenia datada del genotipo ST213 en México

La filogenia datada obtenida muestra que el ancestro común más reciente del genotipo ST213 y los genotipos ST19 y ST313 se puede datar alrededor de 1871 (95% HD1795-1930) (Figura 11). La divergencia inicial de los subclados del genotipo ST213 en México se data cerca del año 1947 (95% HD 1898-1979), mientras que la diversidad de subclados se manifiesta en el año 1989 (95% HD 1982-1996). En la filogenia el genoma MEX36H_2003 se encuentra en una ramificación independiente del resto de los genomas del genotipo ST213, en el que se observan dos clados principales. En el clado I (CI) se encuentran tres genomas de cepas obtenidas de muestras alimento de origen animal, carne de res, y bovino, de los años 2004 y 2009.

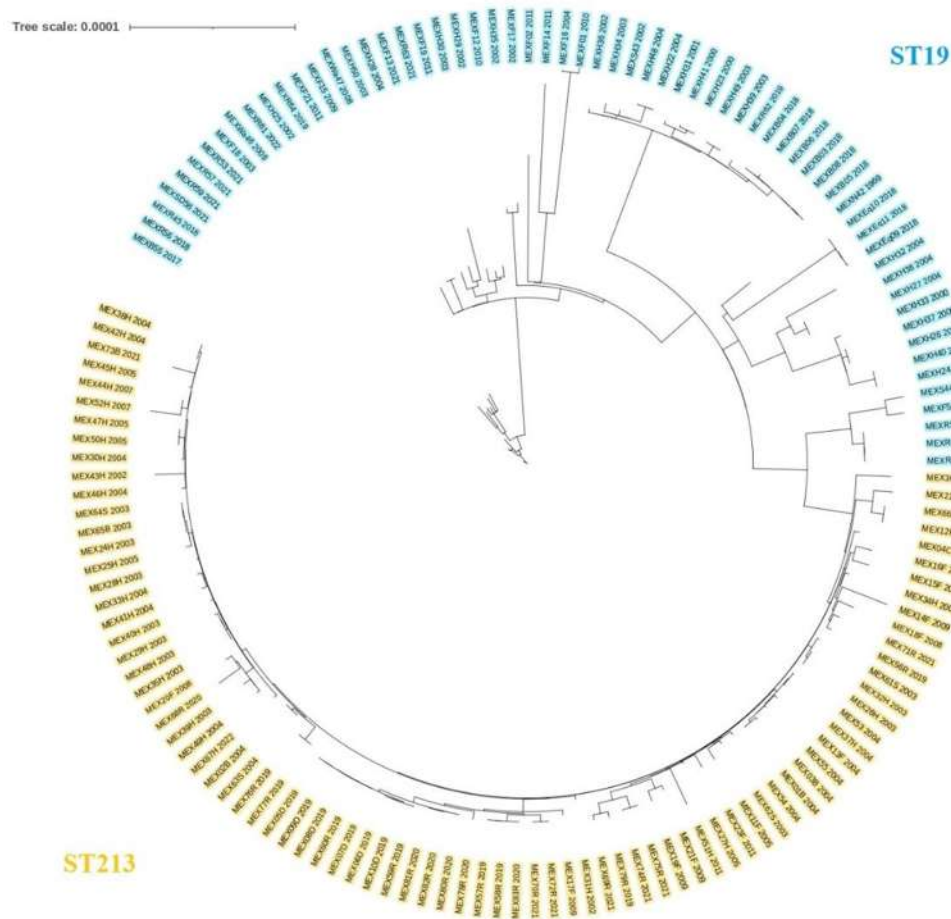


Figura 10. Filogenia de Máxima Verosimilitud construida a partir del alineamiento del genoma núcleo de las cepas ST19 y ST213 obtenido con Roary. Se incluyen los 83 genomas del genotipo **ST213** y 63 genomas del genotipo **ST19**. El modelo óptimo de evolución fue TVM+F+ASC+R2. Se generaron 5000 réplicas de la prueba de relación de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira Hasegawa (SH-aLRT) de soporte de rama, y 5000 réplicas de la prueba de arranque ultrarrápido.

En el clado II se observan dos subclados que a su vez están formados por dos grupos respectivamente. Al subclado I pertenecen el Grupo IA (GIA) y el Grupo IB (GIB), en el primero se encuentran agrupados los genomas de 12 cepas, cuatro de los cuales corresponden a cepas cuyos genomas se secuenciaron en el presente trabajo. Estas cuatro cepas provienen de alimentos de origen animal, mientras que el resto de las cepas de este grupo provienen del ser humano y de agua. En el GIB se encuentran agrupados los genomas de 18 cepas provenientes de distintos tipos de hospedero/ambiente. Sin embargo, hay un subgrupo definido de genomas cuyas cepas provienen de muestras de agua, del periodo 2019-2021. Al subclado II pertenecen el Grupo IIA (GIIA) y el Grupo IIB (GIIB). En el clado GIIA se encuentran agrupados los genomas de 19 cepas, de las cuales 17

proviene de muestras de agua del periodo 2019-2021, y en ramas independientes se encuentran los genomas de dos cepas, una proveniente de humano y la otra de alimento de origen animal. En el GIIB se agrupan los genomas de 30 cepas, de las cuales 22 son de muestras clínicas de humano, cinco de origen animal, una de alimento y dos de agua (Figura 11).

Discusión

En el presente trabajo se realizó un análisis epidemiológico molecular para evaluar las diferencias genómico-epidemiológicas entre cepas de los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* serotipo Typhimurium de México, con la finalidad identificar factores particulares de relevancia en salud pública del genotipo emergente ST213. El análisis contempló la composición genómica de determinantes de resistencia a antibióticos y virulencia, así como la evaluación de los patrones de dispersión y la posible datación de la aparición de dicho genotipo emergente en México. Debido a que se utilizó una aproximación genómica comparativa, el estudio realizado estuvo restringido por la disponibilidad de los genomas de los genotipos de estudio en las bases de datos públicas, así como los genomas generados en este trabajo. Por lo anterior, el número de genomas estudiados de las cepas de cada genotipo fue diferente, aunque muy cercano. Así, en la discusión es importante tener en cuenta que los resultados generados no corresponden a un muestreo dirigido, y que el número de cepas cuyos genomas están disponibles en las bases de datos por tipo de muestra, año y genotipo es asimétrico y corresponde al interés y objetivos de estudio particulares, no para evaluar estadísticamente la situación epidemiológica y de salud pública de los genotipos en México.

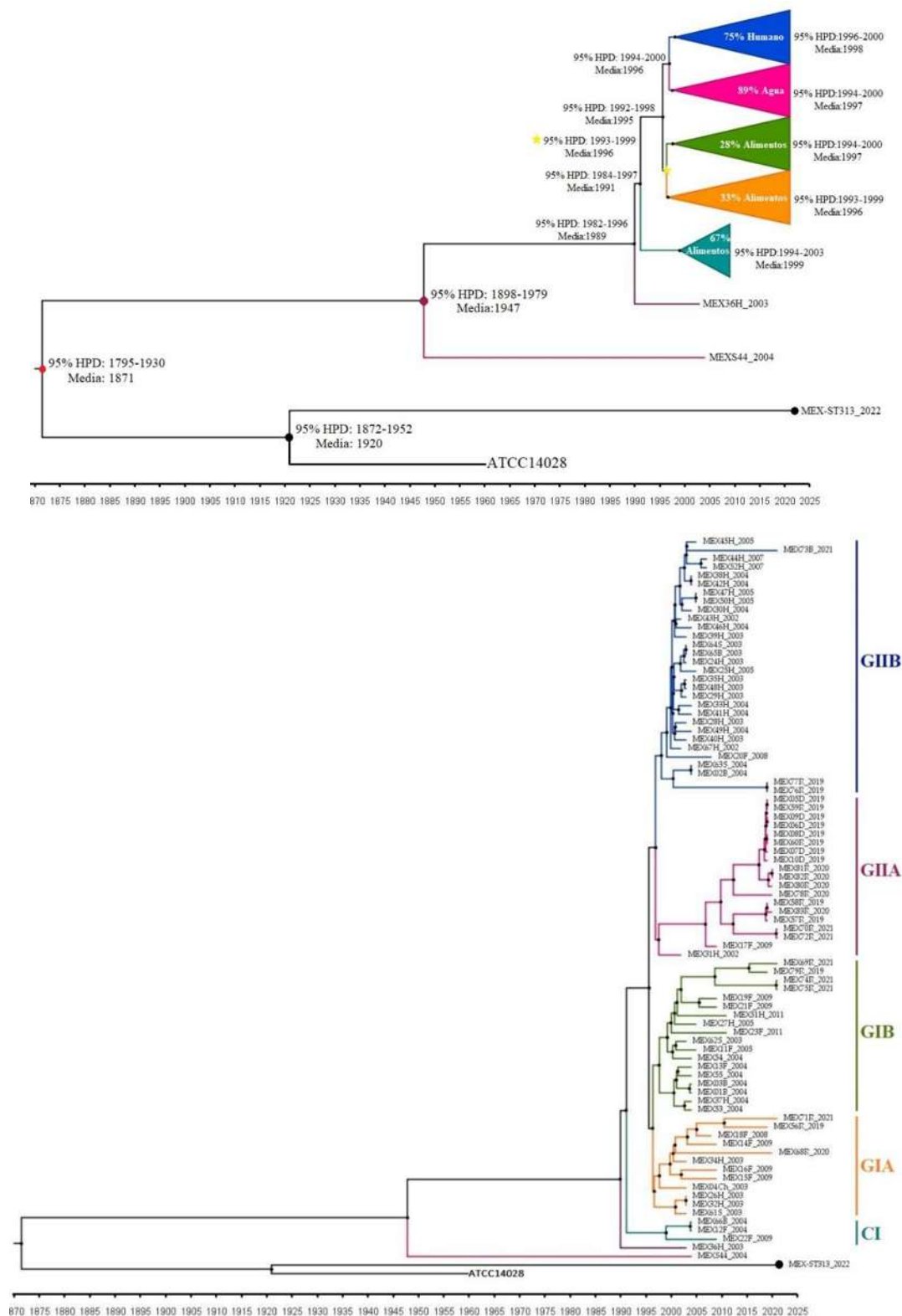


Figura 11. Filogenia datada del genotipo ST213 de *S. Typhimurium* en México. Reconstrucción mediante el criterio Bayesiano empleando el paquete BEAST versión 1.10.4. En cada nodo se muestran los periodos de alta densidad de probabilidad (HPD). En el panel superior los clados terminales están colapsados y en el inferior se muestran en detalle. Ver texto para detalles.

Los genotipos ST19 y ST213 de S. Typhimurium en México portan distinto conjunto de genes de resistencia a antibióticos

En las cepas analizadas se encontraron 49 genes de resistencia a antibióticos de los cuales 38 ya habían sido reportados previamente por nuestro grupo de trabajo en cepas del genotipo ST213 de todo el mundo (Hernández-Díaz et al., 2022). El conjunto de genes encontrados confiere resistencia a por lo menos siete tipos de antibióticos distintos en ST19 y a 11 en ST213, y en la mayoría de los casos existe más de un gen de resistencia para el mismo grupo de antibióticos. De manera interesante, en general, las cepas del genotipo ST213 tienen una mayor cantidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos que las cepas del genotipo ST19 (Tabla S3). Además, las cepas del genotipo ST213 poseen determinantes genéticos de resistencia a antibióticos que no se encuentra en ninguna de las cepas del genotipo ST19. Por ejemplo, aunque en bajo número, las cepas del genotipo ST213 poseen genes de resistencia a colistina, lincosamidas, fosfomicina y macrólidos, los cuales no se encuentran presentes en las cepas del genotipo fundador. Adicionalmente, salvo cuatro cepas del genotipo ST19, el patrón de agrupamiento obtenido con base en el conjunto de genes de resistencia que porta cada cepa individual separa claramente a las cepas por genotipo.

El patrón de agrupamiento obtenido por tipo de muestra indica claramente una relación en el conjunto de genes de resistencia entre cepas de muestras particulares, creando cuatro conjuntos de “ambientes” que parecen intercambiar/mantener grupos de genes de resistencia: i. bovino/humano, ii. cerdo/alimentos/agua de río, iii. pollo/otros/agua de presa y iv. equino/animal silvestre/suelo. Dicho patrón de agrupamiento puede estar asociado a cadenas de transmisión particulares dentro de cada uno de estos grupos de muestras. Esto implicaría que existen subpoblaciones de rutas de dispersión específicas dentro de un mismo genotipo, lo cual tendría que estudiarse con mayor detalle a futuro. Estos cuatro “grupos de ambientes” son congruentes con estudios que muestran la presencia de genes de resistencia a antibióticos distintos entre granjas de ganado bovino, pollos y cerdos, particularmente aquellos encontrados en las excretas de cada especie (Zalewska et al., 2021). Se ha documentado que las cadenas de dispersión de cepas de *S. enterica* con diferencias en los genes de resistencia a antibióticos presentan patrones específicos de una región geográfica (Carroll et al., 2017). Así, la descripción de cadenas de transmisión

particulares en México tiene relevancia epidemiológica y de salud pública, ya que permitiría diseñar estrategias de prevención de genotipos particulares que portan genes de resistencia a antibióticos específicos.

Dentro de la variedad de genes de resistencia encontrados en las cepas de estudio, y particularmente en el genotipo ST213, algunos destacan por su escasa documentación en el serotipo Typhimurium, por la nula descripción en cepas aisladas en México, o por su asociación con plásmidos particulares que pueden favorecer su dispersión horizontal. Por ejemplo, las lincosamidas se utilizan en medicina veterinaria para el tratamiento de infecciones en cerdos, vacas, aves de corral, así como en animales de compañía (Giguère, 2013). La OMS recomienda el uso de clindamicina para el tratamiento de algunas infecciones humanas (WHO, 2022). Dentro de este grupo de fármacos, se ha encontrado que cepas provenientes de aves de corral y muestras clínicas humanas presentan una alta incidencia de resistencia a lincomicina (Oman et al., 2012), aunque en México no existen reportes de perfiles de resistencia a este grupo de antibióticos prácticamente en ningún tipo de muestra. El gen *linG* de resistencia a lincosamidas encontrado en una de las cepas de genotipo ST213 fue descrito por primera vez dentro de un integrón clase 1 en una muestra clínica humana de *S. enterica* serotipo Stanley (Levings et al., 2006), pero no existen referencias sobre su presencia en el serotipo Typhimurium, y tampoco descripciones posteriores de la presencia en algún serotipo de *S. enterica*. El hecho de que este gen se encuentre en un casete del cromosoma bacteriano, y de que el uso de lincosamidas no es generalizado en la medicina veterinaria y humana en México, podría explicar su baja presencia en las cepas de estudio. Debido a que este tipo de fármacos son más utilizados contra bacterias Gram positivas y patógenos anaerobios (Giguère, 2013, WHO, 2022), es posible que este gen haya llegado a *S. enterica* a través de un proceso de transferencia horizontal.

Los genes *bla* de resistencia a antibióticos del tipo β -lactámicos se encuentran presentes en ambos genotipos, compartiendo la presencia de *bla*_{TEM} y *bla*_{CARB-3}, pero con *bla*_{CMY} y *bla*_{CTX-M-14} solo en ST213 y *bla*_{OXA} específicamente en ST19. Se ha documentado que los genes *bla* en cepas el genotipo ST213 aisladas en México se encuentran dentro de plásmidos IncA/C que le confieren resistencia a múltiples antibióticos, particularmente el gen *bla*_{CMY-2} (Wiesner et al., 2009; Wiesner et al., 2011). Las cepas del genotipo ST213

aquí estudiadas portan 19 tipos diferentes de plásmidos Inc (datos no mostrados), siendo particularmente alto en cepas ST213 con el plásmido IncC2. Se ha documentado ampliamente que los plásmidos Inc portan diversos genes de resistencia a β -lactámicos en cepas el serotipo Typhimurium provenientes de animales domésticos, alimentos de origen animal y muestras clínicas humanas (Abraham et al., 2016; Li et al., 2022; Wang et al., 2020), por lo que dichos plásmidos son un vehículo relevante para la transmisión de resistencia a estos antibióticos en el genotipo ST213.

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que el genotipo ST213 ha experimentado procesos de pérdida/ganancia de genes de resistencia a antibióticos distintos a los del genotipo ST19, posiblemente debido a una diferencia en los patrones de dispersión ambiente-hospedero-alimento. También, dichos resultados muestran que las cepas del genotipo ST213 son un reservorio relevante de genes de resistencia a antibióticos más amplio que las cepas del genotipo ST19.

Es importante hacer énfasis en que los antimicrobianos se utilizan ampliamente en la medicina humana y veterinaria en todo el mundo para el tratamiento y la prevención de enfermedades. En los animales destinados a la producción de alimentos, los antimicrobianos también se utilizan para promover el crecimiento, aunque dicha práctica está prohibida en la Unión Europea (UE) desde 2006. La incidencia de enfermedades infecciosas varía entre las especies animales y, en consecuencia, la elección de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento; sin embargo, la mayoría de los grupos de antimicrobianos utilizados en animales también se utilizan con frecuencia en humanos (EMA y EFSA, 2017). La documentación sobre el tratamiento para la gastroenteritis por *Salmonella* no tifoidea (NTS) y *Salmonella* no tifoidea invasiva (iNTS) varía significativamente en la literatura. Sin embargo, los casos de gastroenteritis por NTS generalmente no requieren tratamiento con antibióticos, a excepción de los lactantes menores a seis meses de edad y pacientes inmunocomprometidos. Por otra parte, pacientes con bacteriemia por NTS y aquellos con iNTS deben recibir antibióticos (Haeusler y Curtis, 2013; Wen et al., 2017; Gut et al., 2018). En las décadas de 1950 a 1970 el tratamiento para las infecciones por *S. enterica* incluía el uso de cloranfenicol, ampicilina y cotrimoxazol, pero la concurrente resistencia a los tres antibióticos llevó al uso de otros fármacos (Miró et al., 2004; Song et al., 2015). Esto es interesante, ya que en el presente estudio solo se

identificaron dos genes asociados a la resistencia a cloranfenicol (*floR* y *cml*) y, aunque se encontraron siete genes relacionados con la resistencia a Trimetoprim/Sulfametoxazol (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA17*, *sul1*, *sul2* y *sul3*), cuatro de ellos están presentes en menos del 4% de los genomas analizados. En 2003 la OMS recomendó el uso de fluoroquinolonas y β -lactámicos para el tratamiento de infecciones por *S. enterica* (Miró et al., 2004; Song et al., 2015). Actualmente, se conoce que los antibióticos con actividad contra NTS incluyen β -lactámicos (ampicilina, carbapenémicos, cefalosporinas), polimixinas (colistina), macrólidos (azitromicina) y tetraciclinas (Haeusler y Curtis, 2013; Wen et al., 2017; Gut et al., 2018). El uso de dichos antibióticos puede ponerse en perspectiva con los resultados aquí obtenidos, ya que se identificaron cinco genes asociados a la resistencia a β -lactámicos (*bla_{CARB-3}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-2}*, *bla_{CMY}* y *bla_{CTX-M-14}*), aunque todos ellos presentes en menos del 37% de los genomas estudiados, dos genes diferentes relacionados con la resistencia a colistina (*mcr-1*) y macrólidos (*mphA*) en el mismo genoma y, siete genes de resistencia a tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetR*, *tetR(G)* y *tetU*), cinco de los cuales fueron identificados en menos del 11% de los genomas aquí estudiados. Además, todos los genomas que portaron el gen *tetG*, también portaron el gen *floR*, ambos genes han sido localizados en el mismo plásmido; de la misma forma, *tetU* fue encontrado en el mismo genoma que el replicón rep14a (AUS0004p3), ambos identificados previamente en *Enterococcus faecium*. Estos datos indican que los antibióticos de uso común para el tratamiento de iNTS y NTS, pueden seguir siendo efectivos. No obstante, es importante considerar que la población de *S. enterica* aquí evaluada no es representativa de las cepas circulantes en todos los estados de México, ni de todos los años de muestreo, por lo que lo anterior debe de tomarse con precaución.

En el caso de pacientes inmunocomprometidos y pacientes con VIH se recomienda la administración de fluoroquinolonas, principalmente la ciprofloxacina (Haeusler y Curtis, 2013; Wen et al., 2017; Gut et al., 2018). El principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en las bacterias gramnegativas se debe a mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, además de la presencia de la proteína Qnr (Miró et al., 2004). Once genomas ST213 presentaron una mutación en el gen *gyrA* (datos no mostrados), y se identificaron cinco genes relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas (*oqxA*, *oqxB*, *qnrB5*, *qnrB19* y *qnrA1*), presentes en menos del 21% de los genomas analizados. En

contraste, se identificaron 12 genes diferentes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos, de los cuales, *aac(6)-Iaa* se encontró en el 100% de genomas ST19 y ST213, mientras que *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id* y *aadA2* fueron encontrados en más de 50% de los genomas analizados, aun cuando el uso de aminoglucósidos no se recomienda porque muestran poca eficacia clínica (Haeusler y Curtis, 2013; Wen et al., 2017; Gut et al., 2018). En más del 98% de los genomas aquí estudiados fueron identificados los genes *golS*, *mdsA*, *mdsB* y *mdsC* asociados con la resistencia a β -lactámicos y cloranfenicol, y los genes *mdtK* y *sdiA* relacionados con la resistencia a quinolonas y acriflavina. Ambos grupos de genes asociados a bombas de eflujo de la familia de resistencia-nodulación-división (RND), que en *S. Typhimurium* codifican las bombas AcrAB y MdsABC (Nishino et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Song et al., 2015).

Los genotipos ST19 y ST213 de S. Typhimurium en México portan un conjunto de genes de virulencia similares

En este trabajo se identificaron 119 genes asociados a virulencia en los genomas de las cepas de estudio, de los cuales 99 se encontraron en todos los genomas analizados. Al igual que en el caso de los genes de resistencia a antibióticos, el patrón de agrupamiento generado por la presencia/ausencia de genes de virulencia en los genomas de estudio separa a las cepas del genotipo ST213 de las del genotipo fundador ST19. No obstante, en este caso aparecen dos grupos de genomas ST19 asociados a los ST213. También, las diferencias entre los genotipos son sutiles, debido a que 106 de los genes de virulencia se encontraron en el 95% de los genomas analizados, por lo que prácticamente están presentes en todos los genomas de las cepas de ambos genotipos.

La gran gama de genes de virulencia encontrados en los genomas de las cepas ST19 y ST213 de México es congruente con la amplia documentación del repertorio de genes de virulencia de cepas del serotipo Typhimurium en todo el mundo (Fàbrega y Vila, 2013; Dos Santos et al., 2019). Así, el grupo de genes de virulencia encontrados en los genomas de todas o la mayoría de las cepas de los genotipos estudiados incluyen aquellos involucrados con procesos de adhesión, invasión, formación de fimbrias y flagelos, formación de biopelícula y de maduración de las vacuolas intracelulares en las que se aloja (SCVs por sus siglas en inglés, *Salmonella-containing vacuoles*). También se incluyen genes asociados a la evasión de la respuesta inmune del hospedero y los sistemas de secreción y

de regulación de los genes de virulencia. De manera interesante, entre los genes que se encontraron en la misma proporción de cepas de los dos genotipos se observó una diferencia entre su distribución de acuerdo con los tipos de muestra de procedencia de las cepas. Algunos de estos se comentan con más detalle a continuación.

El gen *shdA* se encontró en 11 genomas de cepas del genotipo ST19 y en 10 de cepas el genotipo ST213, pero en el primer genotipo las cepas procedían de humano y bovino, mientras que en el segundo se encontró en cepas de humano, porcino y agua de río. Esto reforzaría la hipótesis planteada anteriormente de que cada genotipo tiene cadenas de transmisión distintas, como se observó para el caso de la distribución de los genes de resistencia a antibióticos. El gen *shdA* codifica para adhesina que se une a fibronectina y colágeno, localizado en la isla genómica CS54 (Kingsley et al., 2003; Kingsley et al., 2004), presente en cepas provenientes del ser humano y animales de sangre caliente pero ausente en animales de sangre fría (Kingsley et al., 2000). Esta proteína media la adhesión del patógeno al epitelio del ciego en modelo murino (Kingsley et al., 2002), contribuyendo así a la colonización. Debido a esto, ShdA se ha asociado con una mayor proliferación bacteriana en las heces de ganado vacuno y aves domésticas, aumentando su capacidad de dispersión y transmisión entre estos hospederos (Kingsley et al., 2000). Sin embargo, dicha proteína no afecta a la eficiencia y permanencia de las cepas en excreta de cerdos (Boyen et al., 2006), por lo que la relevancia epidemiológica y en salud pública de dicho factor de virulencia depende del ambiente en el que las cepas se estén dispersando.

El gen *gogB* se encontró únicamente en cepas del genotipo ST19. Este gen se encuentra codificado en el fago Gifsy-1 y su producto es la proteína efectora GogB (Coombes et al., 2005). GogB es secretada por el sistema de secreción tipo III (T3SS) y se une a la ubiquitina ligasa tipo SCF E3 del hospedero, con un efecto antiinflamatorio al inhibir la activación de NFκB en macrófagos (Pilar et al., 2012). Así, dicha proteína efectora regula la inflamación provocada por la colonización del patógeno, limitando el daño tisular. Este factor de virulencia solo se había descrito en el serotipo Typhimurium, pero recientemente se identificó en cepas del serotipo Enteritidis asociadas a un brote ocasionado por alimentos contaminados, codificado también por un profago tipo Gifsy-1 (Svahn et al., 2023). De manera interesante, genes codificados dentro del profago Gifsy-1 están asociados a la respuesta de resistencia a condiciones de estrés en *S. Typhimurium*, y

ya se había reportado que no todas las cepas de dicho serotipo portan al profago (Kurasz et al., 2023). Los resultados aquí obtenidos, junto con evidencia previamente citada, muestran que el profago Gifsy-1 no es exclusivo del fenotipo Typhimurium, indican que su presencia es una característica ancestral dentro de los genomas del serotipo Typhimurium y sugieren que el genotipo ST213 lo ha perdido. Esto indicaría que ST213 ha perdido virulencia y capacidad para resistir ciertas condiciones genotóxicas, algo que contradice estudios previos de nuestro equipo de trabajo (Gómez-Baltazar et al., 2019; Gómez-Baltazar et al., 2023), por lo que otros determinantes genéticos asociados a virulencia y resistencia al estrés deben de estar operando en el genotipo emergente.

El gen *rck* se encontró principalmente en el genotipo ST19 y solo en el genoma de una cepa de genotipo ST213. Dicho gen se encuentra dentro del operón *pefI-srgC* dentro de plásmidos de virulencia (pSV) del grupo de incompatibilidad IncF (Pilla y Tang, 2018; McMillan et al., 2020). El gen *rck* codifica para una proteína transmembranal que se orienta hacia el exterior de la célula bacteriana, la cual media la resistencia al sistema del complemento del hospedero evitando la lisis e interviene en la internalización celular (Mambu et al., 2017; Pilla y Tang, 2018). Inicialmente se consideró que este gen se encontraba solo en los serotipos Typhimurium, Bovismorbificans y Enteritidis, pero recientemente se ha documentado al menos en 16 serotipos de la subespecie *enterica* y en otras cuatro subespecies, tanto en el cromosoma como en plásmidos (Koczerka et al., 2021). Con dichos antecedentes, los resultados obtenidos en este trabajo indican que tanto el genotipo ST19 como el ST213 han perdido o no han adquirido significativamente dicho factor de virulencia en México, posiblemente por una baja transmisión horizontal del plásmido que lo porta. Por otra parte, es probable que tanto el fago que porta al gen *gogB* como los plásmidos de virulencia IncF que portan al gen *rck* se propaguen entre las cepas de *S. enterica* que se encuentren en un medio determinado, sin restricción por serotipo. Un muestreo exhaustivo por tipos de muestra podría ayudar a confirmar dicha hipótesis.

Los genotipos ST19 y ST213 presentan un genoma accesorio diferenciado, en parte asociado a sus diferencias en las dinámicas de transmisión

Al realizar el agrupamiento de los genomas de estudio considerando los genes compartidos del genoma accesorio, se observa una clara separación entre los genotipos ST19 y ST213 y

un agrupamiento más compacto de los genomas del primero. Estos resultados indican que el genoma accesorio del genotipo fundador presenta una menor variación en el número de genes accesorios que el del genotipo ST213. También, los resultados sugieren que la adquisición de genes accesorios se ha dado por trayectorias distintas entre ambos genotipos. El principal mecanismo de variación del genoma accesorio en procariotes, particularmente el aumento de genes en el genoma accesorio ocurre mediante transferencia horizontal, a través de distintos elementos genéticos móviles (Brockhurst et al., 2019). A su vez, la frecuencia y eficiencia de la transferencia horizontal, así como la pérdida de genes, están en gran medida determinada por el nicho y las condiciones ecológicas de la bacteria (Brockhurst et al., 2019; McInerney, 2023). Por ejemplo, condiciones de estrés como las especies reactivas de oxígeno dentro del hospedero o la luz UV afuera del hospedero pueden activar mecanismos de transferencia horizontal en enterobacterias (Brockhurst et al., 2019).

Las dinámicas de transmisión de los genotipos ST213 y ST19 muestran similitudes, pero también diferencias significativas. Así, en ambos genotipos el núcleo de dispersión incluye al ser humano y los alimentos de origen animal como componentes principales. Sin embargo, mientras que las cepas del genotipo ST19 obtenidas de humanos se encuentran en el centro de la red de transmisión, en las del genotipo ST213 son los alimentos de origen animal. Además, en este último caso la transmisión de los alimentos a humano, bovinos, cerdos y cuerpos de agua es intensa, mientras que en el primero la transmisión humano-alimentos es la que muestra la mayor intensidad.

Todo lo anterior sugiere que la mayor variación en el genoma accesorio de cepas del genotipo ST213 se debe a su capacidad de ocupar más ambientes fuera del hospedero que las del genotipo ST19, particularmente en condiciones de estrés. Esta hipótesis debe ser abordada con mayor profundidad en análisis posteriores.

Los genotipos ST19 y ST213 han experimentado trayectorias evolutivas independientes desde la primera mitad del siglo XX

El análisis filogenético realizado con SNPs asociados a regiones del genoma núcleo separa claramente a los genotipos ST19 y ST213. Esto es un resultado esperado ya que desde la definición de la Secuencia Tipo se estableció que definían grupos clonales dentro de un

serotipo de *S. enterica* (Achtman et al., 2012). Sin embargo, el análisis filogenómico mediante el uso de SNPs empleando genomas núcleo permite una diferenciación de subgrupos clonales dentro de un mismo genotipo, como se ha documentado en otros genotipos emergentes de *S. enterica* (Okoro et al., 2012). Esa diferenciación tan sutil tiene implicaciones relevantes en epidemiología y salud pública, como en el caso del genotipo ST313, en el que se distinguieron subclonas con distinta localización geográfica y resistencia a antibióticos (Panzenhagen et al., 2018). Lo que permite delimitar espacialmente un riesgo para la salud pública y elaborar estrategias de tratamiento y prevención adecuadas en cada región. Desafortunadamente, la carencia de metadatos relevantes en salud pública, asociados a los genes analizados en el presente trabajo, impiden hacer inferencias similares. Así, el patrón de resistencia fenotípica a antibióticos y la geoposición, o al menos la ciudad de aislamiento de las cepas cuyos genomas se analizaron, serían de mucha ayuda para elaborar riesgos de salud pública detallados espacial y temporalmente.

Algo que si fue posible elaborar en el presente trabajo fue una hipótesis basada en filogenia datada del tiempo en que los genotipos ST19 y ST213 se separaron en México. La filogenia datada obtenida sugiere una separación entre ambos genotipos en el año 1949, y que la diversificación dentro del genotipo ST213 se inició en la última década del siglo pasado. En general, la filogenia datada muestra el surgimiento de cuatro grupos dentro de ST213, uno que se ha adaptado a su permanencia en el ser humano y que aparece en 1998, otro que tiene tiempo residiendo en ambiente acuático que surge en 1997, uno más que muestra su capacidad de residir en el ser humano, bovino y agua, y otro más también relativamente poco especializado.

Estos resultados de filogenia datada corroboran los resultados obtenidos en las redes de dispersión y el agrupamiento por genoma accesorio previamente documentado, esto es, el genotipo ST213 es capaz de vivir fuera del hospedero en una mayor diversidad de ambientes, o bien de colonizar distintos hospederos, estableciendo una dispersión eficiente entre hospederos y el ambiente. Los resultados indican que el genotipo ST213 ha iniciado apenas la formación de subgrupos clonales, sin una definición clara entre hospederos y entre estos y muestras ambientales. La inclusión de un mayor número de cepas del genotipo, en un muestreo apropiado para representar todos los ambientes posibles,

permitirá elaborar hipótesis más robustas sobre el proceso de dispersión del genotipo emergente ST213.

Conclusión

El reemplazo del genotipo ST19 por otros genotipos en diferentes áreas geográficas representa un serio problema de salud pública mundial debido a la virulencia y resistencia múltiple a antibióticos de estos genotipos emergentes. En consecuencia, el aumento en el número de cepas reportadas en bases de datos públicas pertenecientes al genotipo ST213 en todo el mundo muestra la necesidad de estudiar esta variante de *S. Typhimurium*. Los resultados obtenidos al estudiar los genotipos ST19 y ST213 de *S. Typhimurium* en México sugieren que el genotipo ST213 es capaz de vivir fuera del hospedero en una mayor diversidad de ambientes, o bien de colonizar distintos hospederos, estableciendo una dispersión eficiente entre hospederos y el ambiente. Los resultados indican que el genotipo ST213 ha iniciado recientemente la formación de subgrupos clonales. La inclusión de un mayor número de cepas del genotipo, en un muestreo apropiado para representar todos los ambientes posibles, permitirá elaborar hipótesis más robustas sobre el proceso de dispersión del genotipo emergente ST213.

Referencias bibliográficas

- Abraham, S., O'Dea, M., Trott, D. J., Abraham, R. J., Hughes, D., Pang, S., McKew, G., Cheong, E. Y. L., Merlino, J., Saputra, S., Malik, R., Gottlieb, T. (2016). Isolation and plasmid characterization of carbapenemase (IMP-4) producing *Salmonella enterica* Typhimurium from cats. *Scientific Reports*. 6: 35527. <https://doi.org/10.1038/srep35527>.
- Abudahab, K., Prada, J. M., Yang, Z., Bentley, S. D., Croucher, N. J., Corander, J., Aanensen, D. M. (2019). PANINI: Pangenome neighbour identification for bacterial populations. *Microbial genomics*. 5(4), e000220. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000220>.
- Achtman, M., Wain, J., Weill, F. X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M. G., Hale, J. L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L. H., Brisse, S., S. Enterica MLST Study Group (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS pathogens*. 8(6), e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Anna-Lisa V. Nguyen, Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y.,

- Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A. N., Bordeleau, E., Pawlowski, A. C., Zubyk, H. L., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, G. L., Beiko, R. G., Brinkman, F. S. L., Hsiao, W. W. L., Domselaar, G. V., McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*. 48(D1): D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
- Antunes, P., Novais, C., Peixe, L. (2020). Food-to-humans bacterial transmission. *Microbiology Spectrum*. 8(1): 8-1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-201>.
- Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., Feil, E. J., Holden, M. T. G., Yeats, C. A., Grundmann, H., Spratt B. G., Aanensen, D. M. (2016). Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*. 2(11): e000093. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000093>.
- Ashton, P. M., Owen, S. V., Kaindama, L., Rowe, W. P., Lane, C. R., Larkin, L., Nair, S., Jenkins, C., de Pinna, E. M., Feasey, N. A., Hinton J. C. D., Dallman, T. J. (2017). Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Medicine*. 9(1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0480-7>.
- Biswas, S., Li, Y., Elbediwi, M., Yue, M. (2019). Emergence and dissemination of *mcr*-carrying clinically relevant *Salmonella* Typhimurium monophasic clone ST34. *Microorganisms*. 7(9): 298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090298>.
- Boyen, F., Pasmans, F., Donne, E., Van Immerseel, F., Morgan, E., Adriaensen, C., Hernalsteens, J.-P., Wallis, T.S., Ducatelle, R., Haesebrouck, F. (2006). The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella* Typhimurium in pigs. *Veterinary Microbiology*. 115(1-3): 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.006>.
- Brockhurst, M. A., Harrison, E., Hall, J. P., Richards, T., McNally, A., MacLean, C. (2019). The ecology and evolution of pangenomes. *Current Biology*. 29(20): R1094–R1103. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.012>.
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., den Bakker, H., Siler, J., Warchock, S., Kent, D., Lyalina, S., Davis, M., Sisco, W., Besser, T., Warnick, L. D., Pereira, R. V. (2017). Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(12): e00140-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00140-17>.
- Cheng, R. A., Eade, C. R., Wiedmann, M. (2019). Embracing diversity: differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>.
- Coombs, B. K., Wickham, M. E., Brown, N. F., Lemire, S., Bossi, L., Hsiao, W. W., Brinkman, F. S. L., Finlay, B. B. (2005). Genetic and molecular analysis of GogB, a phage-encoded type III-secreted substrate in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with autonomous expression from its associated phage. *Journal of Molecular Biology*. 348(4): 817–830. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.024>.

- de Bernardi-Schneider, A., Ford, C. T., Hostager, R., Williams, J., Cioce, M., Çatalyürek, Ü. V., Wertheim, J. O., Janies, D. (2020). StrainHub: a phylogenetic tool to construct pathogen transmission networks. *Bioinformatics*. 36(3): 945–947. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz646>.
- De Cesare A. (2018). *Salmonella* in foods: A reemerging problem. *Advances in Food and Nutrition Research*. 86, 137–179. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.007>.
- Dos Santos, A. M., Ferrari, R. G., Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*. 76: 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>.
- Elbediwi, M., Wu, B., Pan, H., Jiang, Z., Biswas, S., Li, Y., Yue, M. (2020). Genomic characterization of mcr-1-carrying *Salmonella enterica* serovar 4,[5], 12: i:-ST 34 clone isolated from pigs in China. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8: 663. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00663>.
- Elnekave, E., Hong, S., Mather, A. E., Boxrud, D., Taylor, A. J., Lappi, V., Johnson, T. J., Vannucci, F., Davies, P., Hedberg, C., Perez, A., Alvarez, J. (2018). *Salmonella enterica* serotype 4,[5], 12: i:-in swine in the United States Midwest: an emerging multidrug-resistant clade. *Clinical Infectious Diseases*. 66(6): 877–885. <https://doi.org/10.1093/cid/cix909>.
- EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority). (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). [EMA/CVMP/570771/2015]. *EFSA Journal*. 15(1): 4666. pp. 245 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666>.
- Fàbrega, A., Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2): 308–341. <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-12>.
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E., Conte-Junior, C. A. (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(14): e00591-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>.
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder—an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*. 8(1): 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>.
- Giguère S. 2013. Lincosamides, pleuromutilins, and streptogramins. In *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 5th ed. (ed. Giguère S, Prescott JF, Dowling PM), Wiley, Hoboken, NJ. pp.199–210.
- Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Larsen, J., Kuk-Soberanis, M. E., Vázquez-Marrufo, G. (2019). Comparative stress response to food preservation conditions of ST19 and ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Food Microbiology*. 82: 303–315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.010>.
- Gómez-Baltazar, A., Vázquez-Marrufo, G., Astiazaran-Garcia, H., Ochoa-Zarzosa, A., Canett-Romero, R., García-Galaz, A., Torres-Vega, C., Vázquez-Garcidueñas, M. S. (2023). Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains isolated from food.

- Microbes and Infection.* 25(1-2): 105019. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105019>.
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., Rolain, J. M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(1): 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., Donkor, O. N. (2018). *Salmonella* infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*. 164(11): 1327–1344. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000709>.
- Haeusler, G., Curtis, N. (2013). Non-typhoidal *Salmonella* in Children: Microbiology, Epidemiology and Treatment. In Curtis, N., Finn, A., Pollard, A. (eds) Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 764. Springer, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4726-92>.
- Hernández-Díaz, E. A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Negrete-Paz, A. M., Vázquez-Marrufo, G. (2022). Comparative genomic analysis discloses differential distribution of antibiotic resistance determinants between worldwide strains of the emergent ST213 genotype of *Salmonella* Typhimurium. *Antibiotics*. 11(7): 925. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070925>.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14(6): 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Kingsley, R. A., van Amsterdam, K., Kramer, N., Bäuml, A. J. (2000). The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infection and Immunity*. 68(5): 2720–2727. <https://doi.org/10.1128/iai.68.5.2720-2727.2000>.
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Keestra, A. M., Adams, L. G., Bäuml, A. J. (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Molecular Microbiology*. 43(4): 895–905. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02805.x>.
- Kingsley, R. A., Humphries, A. D., Weening, E. H., De Zoete, M. R., Winter, S., Papaconstantinopoulou, A., Dougan, G., Bäuml, A. J. (2003). Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infection and Immunity*. 71(2): 629–640. <https://doi.org/10.1128/iai.71.2.629-640.2003>.
- Kingsley, R. A., Keestra, A. M., De Zoete, M. R., Bäuml, A. J. (2004). The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Molecular Microbiology*. 52(2): 345–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03995.x>.
- Koczerka, M., Douarre, P. E., Kempf, F., Holbert, S., Mistou, M. Y., Grépinet, O., Virlogeux-Payant, I. (2021). The invasins and complement-resistance protein Rck of *Salmonella* is more widely distributed than previously expected. *Microbiology Spectrum*. 9(2): e01457-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01457-21>.
- Kurasz, J. E., Crawford, M. C., Porwollik, S., Gregory, O., Tadlock, K. R., Balding, E. C., Weinert, E. E., McClelland, M., Karls, A. C. (2023). Strain-specific Gifsy-1 prophage genes are determinants for expression of the RNA repair operon during the SOS

- response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. e00262-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00262-22>.
- Levings, R. S., Hall, R. M., Lightfoot, D., Djordjevic, S. P. (2006). *linG*, a new integron-associated gene cassette encoding a lincosamide nucleotidyltransferase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(10): 3514–3515. <https://doi.org/10.1128/aac.00817-06>.
- Li, L., Wan, X., Olsen, R. H., Xiao, J., Wang, C., Xu, X., Meng, H., Shi, L. (2022). genomic characterization of *mcr-1*-carrying foodborne *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and identification of a transferable plasmid carrying *mcr-1*, *blaCTX-M-14*, *qnrS2*, and *oqxAB* genes from ready-to-eat pork product in China. *Frontiers in Microbiology*. 13: 903268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.903268>.
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*. 50(D1): D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>.
- Makendi, C., Page, A. J., Wren, B. W., Le Thi Phuong, T., Clare, S., Hale, C., Goulding, D., Klemm, E. J., Pickard, D., Okoro, C., Hunt, M., Thompson, C.N., Lan, N. P. H., Hoang, N. T. D., Thwaites, G. E., Hello, S. L., Brisabois, A., Weill, F. X., Baker, S., Dougan, G. (2016). A phylogenetic and phenotypic analysis of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden, an emerging agent of diarrheal disease in tropical regions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(2): e0004446. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004446>.
- Mambu, J., Virlogeux-Payant, I., Holbert, S., Grépinet, O., Velge, P., Wiedemann, A. (2017). An updated view on the Rck invasin of *Salmonella*: still much to discover. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7: 500. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00500>.
- Marchello, C. S., Birkhold, M., Crump, J. A., Vacc-iNTS consortium collaborators. (2022). Complications and mortality of non-typhoidal *Salmonella* invasive disease: a global systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 22: 692–705. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00615-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00615-0).
- Mather, A. E., Phuong, T. L. T., Gao, Y., Clare, S., Mukhopadhyay, S., Goulding, D. A., Hoang, N. T. D., Tuyen, H. T., Lan, N. P. H., Thompson, C. N., Trang, N. H. T., Carrique-Mas, J., Tue, N. T., Campbell, J. I., Rabaa, M. A., Thanh, D. P., Harcourt, K., Hoa, N. T., Trung, N. V., Schultsz, C., ... Baker, S. (2018). New variant of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium associated with invasive disease in immunocompromised patients in Vietnam. *MBio*. 9(5): e01056-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01056-18>.
- McInerney, J. O. (2023). Prokaryotic pangenomes act as evolving ecosystems. *Molecular Biology and Evolution*. 40(1): msac232. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac232>.
- McMillan, E. A., Jackson, C. R., Frye, J. G. (2020). Transferable plasmids of *Salmonella enterica* associated with antibiotic resistance genes. *Frontiers in Microbiology*. 11: 562181. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562181>.
- Metsalu, T., Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 43(W1): W566–W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*. 37(5): 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.

- Miró, E., Vergés, C., García, I., Mirelis, B., Navarro, F., Coll, P., Prats, G., Martínez-Martínez, L. (2004). Resistencia a quinolonas y betalactámicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22(4): 204–211. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73067-0](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73067-0).
- Nishino, K., Latifi, T., Groisman, E. A. (2006). Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*. 59(1): 126–141. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04940.x>.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., et al. (2012). Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature Genetics*. 44(11): 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>.
- Okoro, C. K., Barquist, L., Connor, T. R., Harris, S. R., Clare, S., Stevens, M. P., Arends, M. J., Hale, C., Kane, L., Pickard, D. J., Hill, J., Harcourt, K., Parkhill, J., Dougan, G., Kingsley, R. A. (2015). Signatures of adaptation in human invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 populations from sub-Saharan Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(3): e0003611. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003611>.
- Osman, K. M., Marouf, S. H., Samir, A., AlAtfeehy, N. (2012). The prevalence of multidrug resistance of various numbers of antimicrobial classes, multiple resistance patterns, and distribution of *Salmonella* isolates from human and avian clinical cases of diarrhoea. *Journal of Chemotherapy*. 24(5): 300–304. <https://doi.org/10.1179/112000912X13418499354968>.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pangenome analysis. *Bioinformatics*. 31(22): 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
- Panzenhagen, P. H. N., Paul, N. C., Junior, C. A. C., Costa, R. G., Rodrigues, D. P., Shah, D. H. (2018). Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. *International Journal of Medical Microbiology*. 308(2): 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.005>.
- Petit, R. A., 3rd, Read, T. D. (2020). Bactopia: A flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems*. 5(4), e00190–20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00190-20>.
- Pilar, A. V. C., Reid-Yu, S. A., Cooper, C. A., Mulder, D. T., Coombes, B. K. (2012). GogB is an anti-inflammatory effector that limits tissue damage during *Salmonella* infection through interaction with human FBXO22 and Skp1. *PLoS Pathogens*. 8(6): e1002773. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002773>.
- Pilla, G., Tang, C. M. (2018). Going around in circles: virulence plasmids in enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. 16(8): 484–495. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0031-2>.
- Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M., Hernández, M. (2019). TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 35(21), 4207–4212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz220>.
- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*. 2(1): vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>.

- Song, S., Lee, B., Yeom, J. H., Hwang, S., Kang, I., Cho, J. C., Ha, N. C., Bae, J., Lee, K., Kim, Y. H. (2015). MdsABC-Mediated Pathway for Pathogenicity in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. 83(11): 4266–4276. <https://doi.org/10.1128/IAI.00653-15>.
- Stanaway, J. D., Parisi, A., Sarkar, K., Blacker, B. F., Reiner, R. C., Hay, S. I., et al. (2019). The global burden of non-typhoidal *Salmonella* invasive disease: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*. 19(12): 1312–1324. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30418-9).
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 4(1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C. (2014). The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One*. 9(11): e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>.
- Svahn, A. J., Suster, C. J., Chang, S. L., Rockett, R. J., Sim, E. M., Cliff, O. M., Wang, Q., Arnott, A., Ramsperger, M., Sorrell, T. C., Sintchenko, V., Prokopenko, M. (2023). Pangenome analysis of a *Salmonella* Enteritidis population links a major outbreak to a Gifsy-1-like prophage containing anti-inflammatory gene *gogB*. *Microbiology Spectrum*. 11(2): e02791-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02791-22>.
- Wang, Z., Xu, H., Tang, Y., Li, Q., Jiao, X. (2020). A multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium co-harboring *mcr-1*, *fosA3*, *bla_{CTX-M-14}* in a transferable IncHI2 plasmid from a healthy catering worker in China. *Infection and Drug Resistance*. 13: 3569–3574. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272272>.
- Wen, S. C., Best, E., Nourse, C. (2017). Non-typhoidal *Salmonella* infections in children: Review of literature and recommendations for management. *Journal of Pediatrics and Child Health*. 53(10): 936–941. <https://doi.org/10.1111/jpc.13585>.
- WHO. (2022). The WHO AWaRe (Access, Watch, Reserve) antibiotic book. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Wiesner, M., Zaidi, M. B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J. J., Silva, C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiology*. 9(1): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>.
- Wiesner, M., Calva, E., Fernández-Mora, M., Cevallos, M. A., Campos, F., Zaidi, M. B., Silva, C. (2011). *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiology*. 11(1): 9 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>.
- Yamasaki, S., Nagasawa, S., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., Nishino, K. (2011). AcrA dependency of the AcrD efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *The Journal of Antibiotics*. 64(6): 433–437. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.28>.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., Popowska, M. (2021). Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure—consequences of its application in agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 12: 640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>.

Zepeda-Gurrola, R. C., Vázquez-Marrufo, G., Guo, X., Rodríguez-Luna, I. C., Sánchez-Varela, A., Vázquez-Garcidueñas, M. S. (2021). Difference of MreBCD complex interactome in *Salmonella* Typhimurium ST19 and ST213 genotypes on pathogenesis and stress response pathways. *Current Protein and Peptide Science*. 22(11): 807–821. <https://doi.org/10.2174/1389203722666210921111214>

Material Suplementario

Tabla S1. Metadatos de las cepas de *S. Typhimurium* ST19 y 213 aisladas en México cuyos genomas se analizaron en este trabajo.

Código LGMM	No. Acceso	Tipo de muestra	Año	ST
MEXF01_2010	SRR1177271	Alimentos	2010	19
MEXF02_2011	SRR1427103	Alimentos	2011	19
MEXB03_2018	SRR10189752	Bovino	2018	19
MEXB04_2018	SRR10189753	Bovino	2018	19
MEXB05_2018	SRR10189757	Bovino	2018	19
MEXB06_2018	SRR10189766	Bovino	2018	19
MEXB07_2018	SRR10189767	Bovino	2018	19
MEXB08_2018	SRR10189768	Bovino	2018	19
MEXEq09_2018	SRR9652069	Equino	2018	19
MEXEq10_2018	SRR9652071	Equino	2018	19
MEXEq11_2018	SRR9652084	Equino	2018	19
MEXF12_2010	SRR1035566	Alimentos	2010	19
MEXF13_2021	SRR14943705	Alimentos	2021	19
MEXF14_2011	SRR1593423	Alimentos	2011	19
MEXF15_2009	SRR1685381	Alimentos	2009	19
MEXF16_2004	SRR2104619	Alimentos	2004	19
MEXF17_2002	SRR2878365	Alimentos	2002	19
MEXF19_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	19
MEXF18_2003	SRR4427077	Alimentos	2003	19
MEXF21_2011	traces-0kWgwJD	Alimentos	2011	19
MEXH22_2004	ERR2693956	Humano	2004	19
MEXH23_2000	ERR2693960	Humano	2000	19
MEXH24_2001	ERR2719666	Humano	2001	19
MEXH25_2002	ERR2719675	Humano	2002	19
MEXH26_2000	ERR2719686	Humano	2000	19
MEXH27_2004	ERR2719794	Humano	2004	19
MEXH28_2004	ERR2719913	Humano	2004	19
MEXH29_2002	ERR4401231	Humano	2002	19
MEXH30_2003	ERR4413432	Humano	2003	19
MEXH31_2001	ERR2693683	Humano	2001	19
MEXH32_2004	ERR2710831	Humano	2004	19
MEXH33_2000	ERR2710842	Humano	2000	19
MEXH34_2003	ERR2710857	Humano	2003	19
MEXH35_2002	ERR2710866	Humano	2002	19
MEXH36_2002	ERR2710886	Humano	2002	19
MEXH37_2000	ERR2719650	Humano	2000	19
MEXH38_2004	ERR3901517	Humano	2004	19
MEXH39_2003	ERR3901359	Humano	2003	19
MEXH40_2001	ERR3901483	Humano	2001	19
MEXH41_2000	GCF_001576255	Humano	2000	19
MEXN42_1969	traces-0zaCRhK	ND/Otros	1969	19
MEXS43_2002	ERR4413367	Cerdo	2002	19
MEXS44_2004	ERR2710826	Cerdo	2004	19
MEXR45_2018	traces-0JkyULj	Agua/Río	2018	19
MEXWa46_2008	SRR3092104	Animal silvestre	2008	19
MEXWa47_2008	SRR3092106	Animal silvestre	2008	19
MEXH48_2004	ERR2693595	Humano	2004	19
MEXH49_2003	ERR2693640	Humano	2003	19
MEXH50_2003	ERR2719863	Humano	2003	19
MEXR51_2021	SRR21535520	Agua/Río	2021	19
MEXR52_2021	SRR21535509	Agua/Río	2021	19

MEXR53_2021	SRR21536562	Agua/Río	2021	19
MEXF54_2004	SRR9017231	Alimentos	2004	19
MEXB55_2017	SRR9831928	Bovino	2017	19
MEXR56_2018	traces-0iyLSen	Agua/Río	2018	19
MEXR57_2021	SRR21536563	Agua/Río	2021	19
MEXSD58_2021	SRR21536526	Suelo/Polvo	2021	19
MEXR59_2021	SRR21787367	Agua/Río	2021	19
MEXR60_2021	SRR21787279	Agua/Río	2021	19
MEXR61_2022	SRR22230402	Agua/Río	2022	19
MEXR62_2019	SRR22230686	Agua/Río	2019	19
MEXR63_2021	SRR22231360	Agua/Río	2021	19
MEXR64_2019	SRR22234162	Agua/Río	2019	19
MEX14F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX15F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX16F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX17F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX18F_2008	PRJNA802840	Alimentos	2008	213
MEX19F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX20F_2008	PRJNA802840	Alimentos	2008	213
MEX21F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX22F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	213
MEX23F_2011	PRJNA802840	Alimentos	2011	213
MEX68R_2020	SRR18517463	Agua/Río	2020	213
MEX69R_2021	SRR18544685	Agua/Río	2021	213
MEX70R_2021	SRR18544710	Agua/Río	2021	213
MEX71R_2021	SRR18544717	Agua/Río	2021	213
MEX72R_2021	SRR18544718	Agua/Río	2021	213
MEX73B_2021	SRR20081726	Bovino	2021	213
MEX74R_2021	SRR21786912	Agua/Río	2021	213
MEX75R_2021	SRR21786918	Agua/Río	2021	213
MEX76R_2019	SRR22230420	Agua/Río	2019	213
MEX77R_2019	SRR22230367	Agua/Río	2019	213
MEX78R_2020	SRR22230231	Agua/Río	2020	213
MEX79R_2019	SRR22229564	Agua/Río	2019	213
MEX80R_2020	SRR22228159	Agua/Río	2020	213
MEX81R_2020	SRR22228155	Agua/Río	2020	213
MEX82R_2020	SRR22228152	Agua/Río	2020	213
MEX83R_2020	SRR22234204	Agua/Río	2020	213

Nota. ST – Secuencia Tipo, Código LGMM – Código interno del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana.

Tabla S2. Parámetros de calidad de los genomas ensamblados en este trabajo y obtenidos de las bases de datos de cepas del genotipo ST19 Y ST213 de *S. Typhimurium* aisladas en México.

Código LGMM	Access No.	ST	No. Contigs	Genome Length	Largest Contig	Avg Contigs Length	N ₅₀	GC
MEXF01_2010	SRR1177271	19	78	4933168	656567	8417.53	324913	52.2
MEXF02_2011	SRR1427103	19	76	4957364	694200	9134.21	376787	52.15
MEXB03_2018	SRR10189752	19	127	4934131	454406	3578.00	172301	52.13
MEXB04_2018	SRR10189753	19	214	4956805	322795	1508.39	109289	52.13
MEXB05_2018	SRR10189757	19	103	4934210	545986	5300.83	166596	52.12
MEXB06_2018	SRR10189766	19	118	4940753	382087	3238.03	172302	52.12
MEXB07_2018	SRR10189767	19	103	4939111	454740	4414.95	175428	52.12
MEXB08_2018	SRR10189768	19	117	4935917	441745	3775.60	181079	52.13
MEXEQ09_2018	SRR9652069	19	87	4915822	820846	9435.01	276502	52.15
MEXEQ10_2018	SRR9652071	19	108	4928504	929738	8608.69	324780	52.14
MEXEQ11_2018	SRR9652084	19	99	4917152	929738	9391.29	222891	52.15
MEXF12_2010	SRR1035566	19	87	4944954	548627	6306.06	325559	52.18
MEXF13_2021	SRR14943705	19	84	4914954	660529	7863.44	302871	52.19
MEXF14_2011	SRR1593423	19	99	4859719	626937	6332.70	271004	52.21
MEXF15_2009	SRR1685381	19	214	4980199	590974	2761.56	219123	52.09
MEXF16_2004	SRR2104619	19	81	4931112	656451	8104.33	324913	52.2
MEXF17_2002	SRR2878365	19	186	5024293	274961	1478.28	76343	52.18
MEXF18_2003	SRR4427077	19	66	4884523	571229	8654.98	325073	52.21
MEXF19_2009	PRJNA802840	19	41	4835679	660690	16114.39	377051	52.21
MEXF21_2011	traces-0kWgwJD	19	69	5036984	590791	8562.19	271384	52.18
MEXH22_2004	ERR2693956	19	244	5031524	471846	1933.80	195939	52.12
MEXH23_2000	ERR2693960	19	206	5047674	546726	2654.01	204550	52.1
MEXH24_2001	ERR2719666	19	201	4886378	394193	1961.16	159060	52.11
MEXH25_2002	ERR2719675	19	167	4941361	577663	3459.06	341535	52.17
MEXH26_2000	ERR2719686	19	213	4929062	306158	1437.36	163592	52.08
MEXH27_2004	ERR2719794	19	226	4850489	527667	2334.81	191582	52.16
MEXH28_2004	ERR2719913	19	164	4947838	576825	3517.23	342054	52.13
MEXH29_2002	ERR4401231	19	146	5036698	524381	3591.65	341536	52.19
MEXH30_2003	ERR4413432	19	185	4957518	443686	2398.30	193791	52.18
MEXH31_2001	ERR2693683	19	56	5094706	606156	10824.21	222567	52.08
MEXH32_2004	ERR2710831	19	58	4944233	513255	8849.22	207445	52.07
MEXH33_2000	ERR2710842	19	91	5090559	318179	3496.47	149672	51.88
MEXH34_2003	ERR2710857	19	56	4995461	608341	10863.23	204859	52.1
MEXH35_2002	ERR2710866	19	64	5111854	538415	8412.73	223874	52.16
MEXH36_2002	ERR2710886	19	54	4962343	682005	12629.72	204859	52.11
MEXH37_2000	ERR2719650	19	78	5079872	302051	3872.45	147369	51.86
MEXH38_2004	ERR3901517	19	46	4760640	527300	11463.04	207445	52.18
MEXH39_2003	ERR3901359	19	47	4966805	523652	11141.53	196158	52.11
MEXH40_2001	ERR3901483	19	65	4850243	407102	6263.11	139590	52.13
MEXH41_2000	GCF_001576255	19	2	5027649	4933574	2466787.00	4933574	52.13
MEXN42_1969	traces-0zaCRhK	19	57	4923103	908212	15933.54	301494	52.17

MEXS43_2002	ERR4413367	19	202	5016542	522876	2588.50	196263	52.1
MEXS44_2004	ERR2710826	19	57	5073510	717608	12589.61	215426	51.74
MEXR45_2018	traces-0JkyULj	19	111	4890406	622466	5607.80	121322	52.16
MEXWA46_2008	SRR3092104	19	85	4889321	471833	5550.98	199316	52.19
MEXWA47_2008	SRR3092106	19	86	4969488	627321	7294.43	223715	52.16
MEXH48_2004	ERR2693595	19	60	4941669	682279	11371.32	225813	52.12
MEXH49_2003	ERR2693640	19	82	4999515	746462	9103.20	257733	52.1
MEXH50_2003	ERR2719863	19	59	4917826	627390	10633.73	271390	52.16
MEXR51_2021	SRR21535520	19	57	4753510	720014	12631.82	322100	52.15
MEXR52_2021	SRR21535509	19	55	4752542	720014	13091.16	322100	52.15
MEXR53_2021	SRR21536562	19	100	4807115	542984	5429.84	267545	52.16
MEXF54_2004	SRR9017231	19	96	5094087	715658	7454.77	210718	51.76
MEXB55_2017	SRR9831928	19	127	4879876	276251	2175.20	99079	52.2
MEXR56_2018	traces-0iyLSen	19	107	4889615	718779	6717.56	118349	52.16
MEXR57_2021	SRR21536563	19	65	4812555	577010	8877.08	376793	52.16
MEXSD58_2021	SRR21536526	19	115	4796848	542907	4720.93	253214	52.16
MEXR59_2021	SRR21787367	19	75	4813915	542846	7237.95	376793	52.16
MEXR60_2021	SRR21787279	19	54	4752483	720014	13333.59	282798	52.15
MEXR61_2022	SRR22230402	19	66	4905277	603095	9137.80	376792	52.2
MEXR62_2019	SRR22230686	19	68	4978946	731339	10754.99	225812	52.1
MEXR63_2021	SRR22231360	19	67	4907509	547045	8164.85	461145	52.19
MEXR64_2019	SRR22234162	19	68	4848066	545716	8025.24	290013	52.21
MEX14F_2009	PRJNA802840	213	69	4845819	621554	9008.03	175184	52.08
MEX15F_2009	PRJNA802840	213	36	4799962	714664	19851.78	301237	52.15
MEX16F_2009	PRJNA802840	213	64	5132286	881896	13779.63	259009	51.87
MEX17F_2009	PRJNA802840	213	34	4924086	881344	25921.88	301228	52.03
MEX18F_2008	PRJNA802840	213	51	4961687	700153	13728.49	283075	52.1
MEX19F_2009	PRJNA802840	213	48	4991223	690570	14386.88	282543	52.09
MEX20F_2008	PRJNA802840	213	38	4965399	872543	22961.66	298066	52.05
MEX21F_2009	PRJNA802840	213	50	5020395	875226	17504.52	282876	52.09
MEX22F_2009	PRJNA802840	213	44	4877413	786859	17883.16	283075	51.97
MEX23F_2011	PRJNA802840	213	126	5033426	309052	2452.79	102488	52.06
MEX68R_2020	SRR18517463	213	55	5060198	497657	9048.31	282543	51.85
MEX69R_2021	SRR18544685	213	40	4936825	819130	20478.25	376541	52.02
MEX70R_2021	SRR18544710	213	39	4815462	778337	19957.36	321224	52.12
MEX71R_2021	SRR18544717	213	50	5008651	881346	17626.92	376541	52.12
MEX72R_2021	SRR18544718	213	39	4815013	778521	19962.08	301228	52.12
MEX73B_2021	SRR20081726	213	65	5093678	497917	7660.26	282543	51.91
MEX74R_2021	SRR21786912	213	57	4982175	964068	16913.47	301490	52.04
MEX75R_2021	SRR21786918	213	59	4982849	819457	13889.10	364216	52.04
MEX76R_2019	SRR22230420	213	55	4841194	888701	16158.20	376801	52.13
MEX77R_2019	SRR22230367	213	56	4841530	1054616	18832.43	394003	52.13
MEX78R_2020	SRR22230231	213	61	4911619	888517	14565.85	265101	52.11
MEX79R_2019	SRR22229564	213	55	4952176	881057	16019.22	324878	52.02

MEX80R_2020	SRR22228159	213	48	4851796	881828	18371.42	320588	52.11
MEX81R_2020	SRR22228155	213	50	4883953	779023	15580.46	272910	52.09
MEX82R_2020	SRR22228152	213	54	4886664	881261	16319.65	301484	52.09
MEX83R_2020	SRR22234204	213	63	4853279	667294	10591.97	241598	52.11

NOTA: AVG_CONTIGS_LENGTH – AVERAGE CONTIG LENGTH

Tabla S3. Frecuencia de los genes de resistencia encontrados en los genomas ST19 y ST213 en México.

ST19 (n=64)		ST213 (n=83)	
Grupo de antibiótico/ Gen de resistencia	Frecuencia (%)	Grupo de antibiótico/ Gen de resistencia	Frecuencia (%)
Aminoglucósidos		Aminoglucósidos	
<i>aadA1, ant(3)-IIa</i>	1.5 (n=1)	<i>aph(4)-Ia</i>	1.2 (n=1)
<i>aac(3)-IId, aadA5, sat-1</i>	3.1 (n=2)	<i>aac(3)-IV, aadA1, aadA5</i>	2.4 (n=2)
<i>aph(3)-Ia, aph(3)-Ib</i>	6.2 (n=4)	<i>aph(3)-Ia</i>	3.6 (n=3)
<i>aph(6)-Id</i>	7.8 (n=5)	<i>ant(3)-IIa</i>	4.8 (n=4)
<i>aadA2</i>	26.5 (n=17)	<i>aac(3)-IId</i>	34.9 (n=29)
		<i>aadA2</i>	73.4 (n=61)
		<i>aph(6)-Id</i>	95.1 (n=79)
		<i>aph(3)-Ib</i>	96.3 (n=80)
β-lactámicos		β-lactámicos	
<i>bla_{OXA-2}</i>	1.5 (n=1)	<i>bla_{CARB-3}</i>	1.2 (n=1)
<i>bla_{TEM}</i>	7.8 (n=5)	<i>bla_{CTX-M-14}</i>	2.4 (n=2)
<i>bla_{CARB-3}</i>	26.5 (n=17)	<i>bla_{TEM}</i>	7.2 (n=6)
		<i>bla_{CMY}</i>	66.2 (n=55)
		Colistina	
		<i>mcr-1</i>	1.2 (n=1)
Cloranfenicol		Cloranfenicol	
<i>floR</i>	26.5 (n=17)	<i>cmlA1</i>	1.2 (n=1)
		<i>floR</i>	89.1 (n=74)
Fluoroquinolonas		Fluoroquinolonas	
<i>qnrB19</i>	1.5 (n=1)	<i>qnrA1</i>	1.2 (n=1)
<i>qnrB5</i>	4.6 (n=3)	<i>qnrB5</i>	20.4 (n=17)
		Fosfomicina	
		<i>fosA3</i>	2.4 (n=2)
		Lincosamidas	
		<i>linG</i>	4.8 (n=4)
		Macrólidos	
		<i>mphA</i>	1.2 (n=1)
Sulfonamidas		Sulfonamidas	
<i>sul1</i>	6.2 (n=4)	<i>sul1</i>	3.6 (n=3)
<i>sul2</i>	14 (n=9)	<i>sul3</i>	42.1 (n=35)
		<i>sul2</i>	95.1 (n=79)
Tetraciclinas		Tetraciclinas	
<i>tetC</i>	1.5 (n=1)	<i>tetB, tetU</i>	1.2 (n=1)
<i>tetA, tetR</i>	4.6 (n=3)	<i>tetR</i>	93.9 (n=78)
<i>tetB</i>	6.2 (n=4)	<i>tetA</i>	95.1 (n=79)
<i>tetG, tetR(G)</i>	26.5 (n=17)		
Diaminopirimidinas		Diaminopirimidinas	
<i>dfrA14, dfrA17</i>	3.1 (n=2)	<i>dfrA17</i>	2.4 (n=2)
<i>dfrA1</i>	4.6 (n=3)	<i>dfrA12</i>	67.4 (n=56)
Varios		Varios	
<i>oqxA, oqxB</i>	3.1 (n=2)	<i>oqxA, oqxB</i>	34.9 (n=29)
<i>mdsC</i>	96.8 (n=61)	<i>qacH</i>	42.1 (n=35)
<i>qolS, mdsA, mdsB</i>	98.4 (n=62)	<i>qolS, mdsA, mdsB, mdsC</i>	100 (n=83)

Tabla S4. Perfiles genómicos de virulencia (PGV) de los genomas ST19 y ST213 en este estudio.

PGV	GENOMAS	GENES ¹	ST	No. GENES
PGV12	1	<i>entB, sinH, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	213	104
PGV13	1	<i>entB, mig-14, pipB2, sinH y sseK1.</i>	213	104
PGV14	1	<i>entB, mig-14, pipB2, sinH, sseI/srfH, y sspH2.</i>	19	105
PGV15	1	<i>entB, entE, mig-14, pipB2, sinH, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	213	107
PGV16	1	<i>entB, entE, mig-14, pipB2, shdA, sinH, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	213	108
PGV17	1	<i>entB, mig-14, pipB2, rck, shdA, sinH, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	213	108
PGV18	1	<i>entB, entE, gogB, grvA, mig-14, pipB2, sinH, sseI/srfH y sseK1.</i>	19	108
PGV19	1	<i>entB, gogB, grvA, mig-14, pipB2, shdA, sinH, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	109
PGV20	1	<i>entB, grvA, mig-14, pipB2, rck, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	111
PGV21	1	<i>entB, gogB, grvA, mig-14, pipB2, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	111
PGV22	1	<i>gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	115
PGV23	1	<i>entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	115
PGV24	1	<i>entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	115
PGV25	1	<i>entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sspH1 y sspH2.</i>	19	116
PGV26	1	<i>entB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, shdA, sinH, spvB, spvC, spvR, sseI/srfH, sseK1 y sspH2.</i>	19	116

¹**Nota.** No se muestran los 99 genes que se encontraron en el total de los genomas estudiados.

CAPÍTULO II



antibiotics



Article

Comparative Genomic Analysis Discloses Differential Distribution of Antibiotic Resistance Determinants between Worldwide Strains of the Emergent ST213 Genotype of *Salmonella* Typhimurium

Elda Araceli Hernández-Díaz ^{1,†}, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas ^{2,†}, Andrea Monserrat Negrete-Paz ¹ and Gerardo Vázquez-Marrufo ^{1,*}

¹ Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Col. La Palma Tarímbaro, Morelia 58893, Michoacán, Mexico; 0617452b@umich.mx (E.A.H.-D.); andrea.negrete@umich.mx (A.M.N.-P.)

² División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ave. Rafael Carrillo esq. Dr. Salvador González Herrejón, Col. Cuauhtémoc, Morelia 58020, Michoacán, Mexico; soledad.vazquez@umich.mx

* Correspondence: gvazquez@umich.mx; Tel./Fax: +52-01-443-2-95-80-29

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Hernández-Díaz, E.A.; Vázquez-Garcidueñas, M.S.; Negrete-Paz, A.M.; Vázquez-Marrufo, G. Comparative Genomic Analysis Discloses Differential Distribution of Antibiotic Resistance Determinants between Worldwide Strains of the Emergent ST213 Genotype of *Salmonella* Typhimurium. *Antibiotics* **2022**, *11*, 925. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070925>

Academic Editor: Teresa V. Nogueira

Received: 20 June 2022

Accepted: 7 July 2022

Published: 9 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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/>).

Abstract: *Salmonella enterica* constitutes a global public health concern as one of the main etiological agents of human gastroenteritis. The Typhimurium serotype is frequently isolated from human, animal, food, and environmental samples, with its sequence type 19 (ST19) being the most widely distributed around the world as well as the founder genotype. The replacement of the ST19 genotype with the ST213 genotype that has multiple antibiotic resistance (MAR) in human and food samples was first observed in Mexico. The number of available genomes of ST213 strains in public databases indicates its fast worldwide dispersion, but its public health relevance is unknown. A comparative genomic analysis conducted as part of this research identified the presence of 44 genes, 34 plasmids, and five point mutations associated with antibiotic resistance, distributed across 220 genomes of ST213 strains, indicating the MAR phenotype. In general, the grouping pattern in correspondence to the presence/absence of genes/plasmids that confer antibiotic resistance cluster the genomes according to the geographical origin where the strain was isolated. Genetic determinants of antibiotic resistance group the genomes of North America (Canada, Mexico, USA) strains, and suggest a dispersion route to reach the United Kingdom and, from there, the rest of Europe, then Asia and Oceania. The results obtained here highlight the worldwide public health relevance of the ST213 genotype, which contains a great diversity of genetic elements associated with MAR.

Keywords: ST213 worldwide strains; genomic databases; antibiotic resistance plasmids; Typhimurium

1. Introduction

Salmonella enterica is one of the main pathogens associated with food contamination; it is considered responsible for around 94 million cases of gastrointestinal illnesses and 155,000 annual deaths worldwide [1–3]. The typing method used for the follow-up of outbreaks and epidemiological studies of *S. enterica* for nearly 90 years is serotyping [4]. Currently, more than 2600 serotypes are registered worldwide [5,6]. The Typhimurium and Enteritidis serotypes are considered of the greatest global public health relevance, because these have the widest geographical distribution and the highest incidence in clinical and food samples worldwide [7,8]. However, among the plethora of molecular genetic typing methods generated in the last few decades, comparative genomic analysis stands out for its greater discrimination power, making it possible to distinguish strains associated with an

outbreak from those that are not [9–11]. This discrimination power is of epidemiological and public health relevance, since it allows the generation of strategies for the prevention and control of outbreaks [12–14].

Among the genotyping methods used as epidemiological tools for the study of *S. enterica*, multi locus sequence typing (MLST) for the assignment of sequence type (ST) through variations in seven loci efficiently identify clonal groups and founder genotypes [15,16]. Recently, MLST analysis was modified in accordance with the possibilities offered by whole-genome sequencing (WGS) to use a large number of genes from the core genome [17–19], enabling the differentiation between clonal groups to be more precise, allowing the description of emerging genotypes, and making it possible to distinguish between lineages within an ST [20–22]. This resolution power offered by MLST using WGS opens the possibility of comparing strains between very diverse space-time scales; in addition to its application in epidemiological studies, this allows evaluating the micro-evolutionary process of *S. enterica* and detecting the emergence of variants of relevance in the field of public health [21–23]. Beyond its excellent ability to discriminate between clonal groups and variants within an ST, comparative genomic analysis allows the study of dispersion and distribution of virulence and resistance to antibiotics-associated genes [24–28] and relevant genetic determinants of *S. enterica* emerging pathogenic variants.

MLST analysis has clearly established that the founding genotype of *S. enterica* Typhimurium is ST19, as the most prevalent genotype of this serotype around the world from which the vast majority of other STs have been derived [15,16]. However, it has been recently documented that some countries have experienced the ST19 being replaced with other STs that show a higher incidence in clinical and food samples. These replacement genotypes have genotypic and phenotypic characteristics that make them relevant in terms of epidemiology and public health. In this sense, the best documented cases of replacement are replacements by the ST313 genotype, which have been identified in Sub-Saharan Africa and are associated with systemic disease in HIV patients. Thus far, two sub-lineages have been identified, one of which has resistance to antibiotics, complicating the treatment of HIV [21,29]. The increased incidence of the ST34 genotype carrying antibiotic resistance genes/plasmids has been documented in some regions of China in both clinical and food samples [30,31].

In Mexico, a study on clinical and food samples carried out for four years in different states of the country revealed evidence of the replacement of ST19 by ST213 [32]. Subsequent analyses showed that this strain carries IncA/C plasmids, now changed to IncC [33], with genetic determinants for multiple resistance to antibiotics [34]. According to the genome metadata available in Enterobase [35], the ST213 genotype has been isolated in recent years from different regions of the world. However, to date the epidemiological risk associated with the geographical dispersion of this genotype sequence is unknown, as is whether the patterns of resistance to antibiotics are shared between strains from different regions.

It has been documented that bioinformatic genomic analysis allows the robust prediction of phenotypic resistance to antibiotics in *S. enterica* [28,36]. Thanks to the considerable increase in the available genomes of ST213 from different regions of the world, it is feasible to perform an analysis that allows establishing solid hypotheses about the resistance of this genotype to antibiotics. Furthermore, it is possible to establish whether the strains from different geographical regions have the same set of genetic determinants of resistance to antibiotics and the presence of multi-resistance between them. Therefore, the objective of this work was to carry out a comparative genomic analysis of all ST213 strains whose genomes are available in public databases in order to analyze the presence and distribution of genes and mutations associated with antibiotic resistance. Differences in the presence/absence of genetic determinants associated with resistance to antibiotics in relation to the geographical origin, year of isolation, and type of samples of ST213 genotype strains are analyzed and discussed.

2. Results

2.1. Distribution of the Genomes of the Strains Analyzed by Country, Type of Sample and Year of Isolation

Of the 220 genomes retrieved from databases of *S. Typhimurium* strains belonging to the ST213 genotype and included in this study, 29% ($n = 64$) came from the United Kingdom, 25.9% ($n = 57$) came from Mexico, 24.5% ($n = 54$) came from the United States of America, and 9.5% ($n = 21$) came from Canada, while the remaining 11% ($n = 24$) were obtained from nine different countries, mainly from Europe (Figure 1).

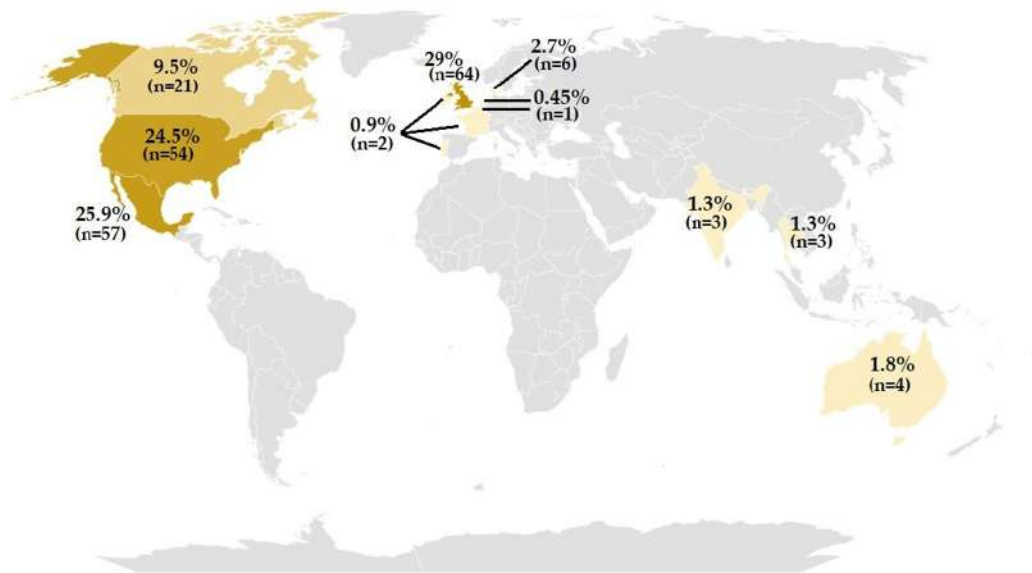


Figure 1. World distribution of the *Salmonella enterica* Typhimurium strain genotype ST213, the genomes of which were analyzed in this work.

A total of 70% ($n = 154$) of the strains were obtained from human clinical samples, 15% ($n = 33$) were obtained from samples of animal origin, and the remaining 15% ($n = 33$) were obtained from nine other sources in smaller percentages (Figure 2). In relation to the year of isolation, the genomes were derived from strains isolated between the years 1957 and 2021, with the years 2003, 2004, 2017, 2018, and 2019 being the ones in which the largest number of records were made. Between 2002 and 2005, most of the Mexican records were made; between 2014 and 2019, the largest number of records from the United Kingdom were obtained; and the strains from the United States were all registered in 19 years, apart from the years 1965, 1967, 2001, 2004, 2005, 2008, and 2009. It is interesting to note that, so far, during the year 2013, no isolates of ST213 have been recorded in any geographical area (Figure 3).

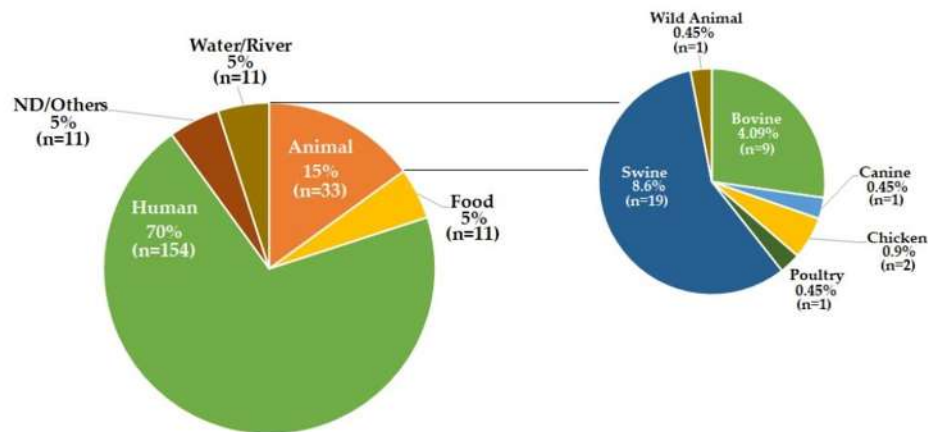


Figure 2. Sample type provenance of the ST213 strains from which genomes were analyzed in this work. The number of strains (*n*) for each sample type is given in parenthesis. The total number of genomes analyzed after filtering was 220 (see Figure 8).

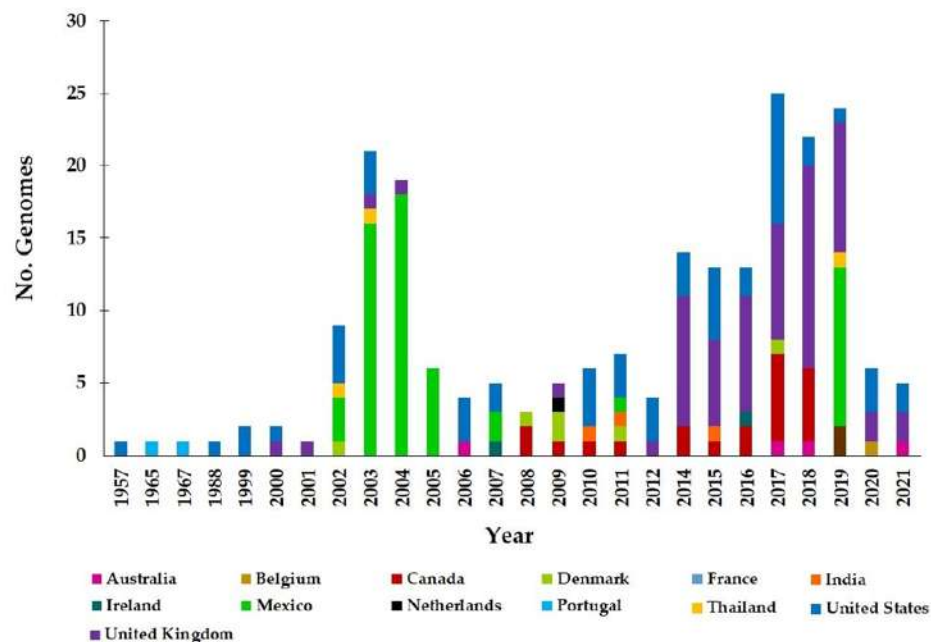


Figure 3. Year of isolation of the ST213 strains from which genomes were analyzed in this work. The total number of genomes analyzed after filtering was 220 (see Figure 8).

2.2. Presence of Antibiotic Resistance Genes

Forty-four antibiotic resistance genes were identified in the analyzed genomes (Table 1), of which *aac(6)-Iaa*, *golS*, *mdsA*, *mdsB*, *mdsC*, *mdtK*, and *sdiA* are present in the 220 (100%) genomes analyzed. The genes *aac(3)-IV*, *aph(3)-IIa*, *aph(4)-Ia*, *bla_{CARB-3}*, *catIII*, *cmlA1*, *dfrA1*,

linG, *mefB*, *qnrA1*, *qnrB19*, *qnrS1*, *tetM*, and *tetU* were found in <1% of the genomes studied. The *aadA5*, *ant(3)-IIa*, *aph(3)-Ia*, *bla_{TEM-1}*, *dfrA17*, *qnrB5*, *sul1*, *tetB*, and *tetC* genes were found in between 1 and 15% of the genomes included in this study, while the *aac(3)-IIa*, *aadA2*, *bla_{CMY-59}*, *dfrA12*, *floR*, *oqxA*, *oqxB*, *qacH*, *sul2*, and *sul3* genes were identified in 20% to 40% of the study genomes. Finally, the *aph(3)-Ib*, *aph(6)-Id*, *tetA*, and *tetR* genes were found in 50–57% of all the analyzed genomes (Table 1). Regarding the type of sample from which the genomes were isolated, the *bla_{CARB-3}* gene was only found in strains from samples of animal origin, the *bla_{CMY-59}* gene was not found in strains from food, and *bla_{TEM-1}* was identified in strains taken from water samples. On the other hand, the *linG* gene was found in food-associated strains and *mefB* was identified in human clinical samples from the United Kingdom and the United States, respectively. Regarding the country from which the strains were obtained, ten of the genes that confer resistance to aminoglycosides were found in the genomes of strains from Australia, Canada, Denmark, Thailand, Mexico, the United Kingdom, and the United States. Genes related to resistance to β -lactams and fluoroquinolones were not found in the genomes of strains from Denmark, and genes related to resistance to chloramphenicol were not found in the genomes of strains from Thailand. Similarly, tetracycline and diaminopyrimidine resistance genes were not found in strains from Denmark and Thailand, while the *qacH* gene was not identified in the genomes of strains isolated in Australia.

Table 1. Resistance genes found in the analyzed genomes of ST213 strains.

Antibiotic Group/Resistance Gene(s)	Encoded ¹	% Frequency ²
Aminoglycosides		
<i>aph(4)-Ia</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>ant(3)-IIa</i> , <i>aac(3)-IIa</i>	P (IncHI2)	0.4 (n = 1), 0.9 (n = 2), 10.9 (n = 24), 29 (n = 64)
<i>aph(3)-IIa</i> , <i>aph(3)-Ia</i>	T	0.9 (n = 2), 9.5 (n = 21)
<i>aac(6)-Iaa</i>	C	100 (n = 220)
<i>aadA2</i>	P/I (IncHI2/IncHI2A)	40 (n = 89)
<i>aadA5</i>	P/T/I	1.8 (n = 4)
<i>aph(3)-Ib</i>	P/T/C (IncC, IncFII/IA/IB)	50 (n = 111)
<i>aph(6)-Id</i>	P/CG-1 (IncC, IncFII/IA/IB)	50 (n = 110)
Cephamycin		
<i>bla_{CMY-59}</i>	P (IncC)	36.8 (n = 81)
Diaminopyrimidines		
<i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA17</i>	I	0.4 (n = 1), 37.2 (n = 82), 1.8 (n = 4)
Penam		
<i>bla_{CARB-3}</i>	P	0.4 (n = 1)
Penam, penem, cephalosporin, monobactam		
<i>bla_{TEM-1}</i>	C/P (IncHI2/IncHI2A)	14 (n = 31)
Disinfecting agents and intercalating dyes		
<i>qacH</i>	P	26.3 (n = 58)
Fluoroquinolones		
<i>mdtK</i>	C	100 (n = 220)
<i>qnrA1</i> , <i>qnrB5</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i>	P (IncHI2/IncHI2A)	0.4 (n = 1), 10 (n = 22), 0.4 (n = 1), 0.9 (n = 2)
Lincosamides		
<i>linG</i>	I-agg, with <i>aadA2</i>	0.4 (n = 1)
Macrolides		
<i>mefB</i>	P, located in the <i>sul3</i> vicinity	0.4 (n = 1)
Sulfonamides		
<i>sul1</i>	C-1 I	8.6 (n = 19)
<i>sul2</i>	SP (IncHI2, IncC, IncFII/IA/IB)	49.5 (n = 109)
<i>sul3</i>	P (IncHI2/IncHI2A)	27.2 (n = 60)
Tetracyclines		
<i>tetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetR</i>	C/P (IncHI2, IncC, IncFII/IA/IB)	56.8 (n = 125), 1.8 (n = 4), 55.9 (n = 123)
<i>tetC</i>	P (IncHI2/IncHI2A/IncI1_I γ)	1.3 (n = 3)
<i>tetU</i>	P (pKQ10)	0.4 (n = 1)
<i>tetM</i>	T	0.4 (n = 1)
Phenicol		

Table 1. Cont.

Antibiotic Group/Resistance Gene(s)	Encoded ¹	% Frequency ²
<i>catII</i> (<i>E. coli</i> K-12), <i>cmlA1</i> , <i>floR</i>	C/P (IncHI2/ IncHI2A/ IncI1_I_γ/IncQ1, IncC)	0.4 (<i>n</i> = 1), 0.9 (<i>n</i> = 2), 47.7 (<i>n</i> = 105)
Phenicol, β-lactams, diaminopyrimidines, fluoroquinolones, glycyl-cyclines, nitrofurans and tetracyclines, rifamycin, triclosan.		
<i>golS</i> , <i>mdsA</i> , <i>mdsB</i> , <i>mdsC</i>	C	100 (<i>n</i> = 220)
<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	C/P (IncHI2)	24.5 (<i>n</i> = 54)
<i>sdiA</i>	C/P	100 (<i>n</i> = 220)

Note: ¹ C, chromosome; CG-I, chromosome genomic islands; C-1 I, class 1 integron; I, integrons; Iagc, Integron-associated gene cassette; P, plasmids; SP, small plasmids; T, transposon. ² Number of genomes in which each gen/plasmid was found is given in parentheses.

2.3. Antibiotic Resistance Mutations

A total of five point mutations associated with codon/amino acid changes that confer resistance to fluoroquinolones were found in the analyzed genomes, four of which were found in the *gyrA* gene and one of which was found in the *parC* gene (Table 2). The most frequent mutation was p.S83Y, which was carried by 23 genomes, whereas the least frequent were p.D87G and p.S80I, which were present in one genome each. Except for the genome of one Thailand strain, the rest of the genomes carrying such mutations belonged to North American strains, with one coming from Canada, nine from Mexico, and 19 from the USA (Table 2).

Table 2. Mutations associated with antibiotic resistance in the analyzed genomes.

Mutation	Codon Change	Amino Acid Change	Genome	% of Genomes ¹
<i>gyrA</i> p.D87G	GAC → GGC	D → G	MEX04C_2003	3.4 (<i>n</i> = 1)
<i>parC</i> p.S80I	AGC → ATC	S → I	US37H_2015	3.4 (<i>n</i> = 1)
<i>gyrA</i> p.S83F	TCC → TTC	S → F	MEX22F_2008	6.8 (<i>n</i> = 2)
			MEX51H_2011	
<i>gyrA</i> p.D87N	GAC → AAC	D → N	US17H_2011	10.3 (<i>n</i> = 3)
			US19H_2011	
			US43H_2011	
<i>gyrA</i> p.S83Y	TCC → TAC	S → Y	CAN20H_2017	79.3 (<i>n</i> = 23)
			MEX14F_2009	
			MEX15F_2009	
			MEX16F_2009	
			MEX18F_2008	
			MEX34H_2003	
			MEX56R_2019	
			THA01C_2019	
			US07B_2020	
			US12B_2021	
			US18H_2010	
			US20H_2015	
			US21H_2015	
			US22H_2015	
			US24H_2016	
			US28H_2012	
			US30H_2017	
			US37H_2015	
			US38H_2017	
			US44H_2010	
			US46H_2010	
			US47H_2017	
			US49B_2019	

Note: ¹ Percentage of genomes that carry each plasmid. The number of genomes for each case is shown in parentheses. The total number of analyzed genomes was 220.

2.4. Plasmid Replicons Detection

Thirty-three different plasmid replicons were found in the analyzed genomes, of which 23 were identified in fewer than 5% of the study genomes, seven in more than 5% but fewer than 30%, two in 34%, and one in 47.7%. However, twelve of the analyzed genomes did not present plasmid replicons. Of the detected plasmids, it was recently proposed that the IncA/C2 denomination must be discarded and replaced by the IncC nomenclature [33]; thus, in the present paper, all bioinformatic detection of IncA/C2 in this work was designed as IncC. Despite the bioinformatics detection of plasmid replicons, it must be taken into account that, although this occurs infrequently, plasmids can be integrated in the bacterial chromosome or co-integrated in a plasmid with multiple replicons [37,38].

In relation to the type of sample used, the ColRNAI, IncC, and IncFIB(K)_1_Kpn3 plasmids were present in all the genomes of all the sample types analyzed here. Plasmids IncP1 and IncQ1 were only found in strains of samples of animal origin, while plasmids Col(BS512), IncFIC(FII), IncFII(pCTU2)_1_pCTU2, IncI2, IncI2_1_δ, IncX4, pESA2, pSL483, and rep14a_4_rep(AUS0004p3) were identified only in strains obtained from human clinical samples. In the case of the plasmids Col(MG828), Col440II, IncFIA, IncFIB(AP001918), IncFII, IncFII(pCoo)_1_pCoo, and IncX, these were found in genomes whose strains came from samples of both animal and human origin. Plasmids IncHI1A and IncHI1B(R27)_1_R27 were identified in strains from samples of animal and undefined origin, while Col156 and ColpVC were found in strains of animal and human origin as well as in food samples. Plasmid IncFIA(HI1)_1_HI1 was only found in strains from undefined samples; IncI_γ_1 was found in strains of animal, human, and undefined origin; and Col440I was not found in the genomes of food-associated strains. Plasmids IncFIB(S), IncFII(S), IncHI2A, IncHI2, and IncI1_1_α_1 were not identified in strains identified from water samples. On the other hand, the plasmids IncFIC(FII), IncI2_1_δ, pESA2 rep14a_4_rep(AUS0004p3), and IncFII(pCTU2)_1_pCTU2 were identified in the genomes of strains isolated in Mexico; pSL483 was identified only in strains from Canada; IncI2 was identified only in strains from the United Kingdom, and Col(BS512), IncFIA(HI1)_1_HI1, IncFIA, IncP1, and IncQ1 were identified only in strains from the United States. Plasmids IncX4 and IncI_γ_1 were found only in the genomes of strains from the United States and the United Kingdom; IncFII was found only in strains from Canada and the United States; and IncFIB(AP001918), IncFII(pCoo)_1_pCoo, IncHI1A, IncHI1B(R27)_1_R27, IncHI2, and IncHI2A were identified only in strains from Mexico and the United States. In the case of the Col(MG828) and IncX plasmids, they were identified in strains from Canada, Mexico, and the United States; Col156 and Col440II in strains from Canada, the United States, and the United Kingdom; ColpVC were identified in strains from Mexico, the United States, and the United Kingdom; Col440I and IncFIB(K)_1_Kpn3 were identified in strains from these three North American countries and the United Kingdom; and ColRNAI and IncC were identified in strains from North America, the UK, and Australia. Finally, the IncI1_1_α_1 plasmid was not found in strains from Australia, France, India, Ireland, the Netherlands, or Portugal, and the IncFIB(S), IncFII(S) plasmids were not present in the genomes of strains from Mexico and Portugal.

2.5. Grouping Patterns

When the presence/absence of resistance genes in the study genomes is used as a matrix for the generation of clustering patterns, interesting groups can be observed in relation to the country and the sample of origin of the strains. The presence of resistance genes brings together the strains from the three North American countries (Canada, Mexico, USA), as well as those from the United Kingdom and Australia. Mexico and the United States appear together in a subcluster while Canada, the United Kingdom, and Australia are grouped in another branch (Figure 4). In the other large cluster, the strains from European countries appear alongside strains from India and Thailand, with the strains from the latter and Denmark being distinguished by the presence of particular resistance genes that have previously been mentioned. Regarding the clustering pattern of the heat map generated

when information on the presence/absence of resistance genes in the analyzed genomes is combined with the type of sample used, the genomes from chicken-, water-, swine-, and non-determined-origin strains cluster in the first group (Figure 5). Food and bovine samples are grouped together, and human samples are segregated in a single terminal ramification. Genomes derived from poultry and canine strains cluster in the last group.

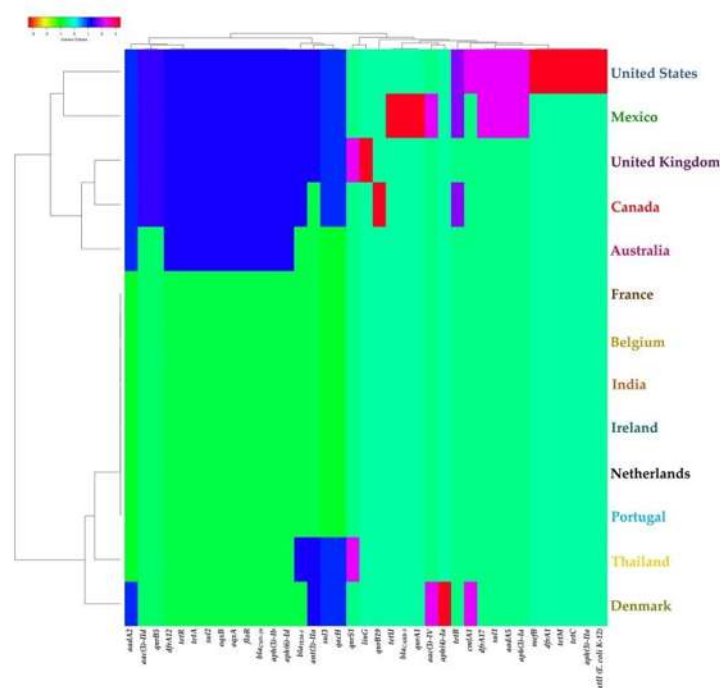


Figure 4. Grouping pattern by country of isolation and resistance genes identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work. A binary matrix of presence (1)/absence (0) of each gene shown was used as an input for grouping using Manhattan and UPGMA for the calculation of distances and the generation of the grouping pattern, respectively. See the Section 4 for details.

Regarding the grouping pattern created by the presence/absence of resistance genes from each individual genome/strain, it can be seen that two larger clusters are clearly defined (Figure 6). The first includes mainly genomes from UK strains along with two Canadian genomes and all the European, Asian, and Australian samples (Figure 6, cluster A). This first cluster also includes, though in a different subgroup, several North American samples (Canada, Mexico, USA), two samples from the UK, and one sample from Thailand. The second main cluster contains genomes/strains exclusively from the three North American countries, and only three UK samples are dispersed in the three subgroups of this cluster (Figure 6, cluster B).

The plasmid replicons presence/absence grouping pattern shows a similar pattern to that observed for previously described resistance genes. Genomes of countries from North American (Canada, Mexico, USA) strains shape the first big cluster, with one strain from the UK and one from Australia (Figure 7, cluster A). The second big cluster is composed of European, Asian, and Australian genomes/strains, with five samples from Canada, one from Mexico, and one from the USA dispersed in the subgroups of the cluster (Figure 7,

cluster B). A total of three small clusters are made up of genomes of strains from Mexico and the USA, as well as one from the UK (Figure 7, clusters C–E).

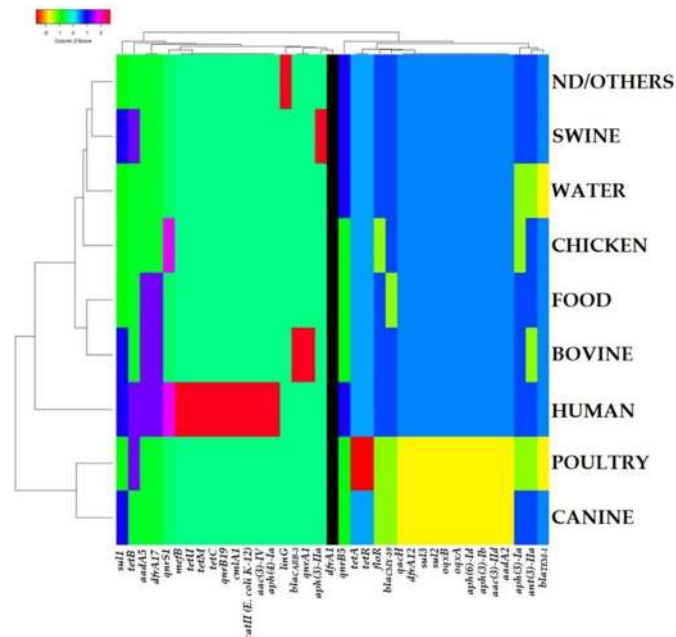


Figure 5. Grouping pattern by type of sample of isolation and resistance gene identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work. A binary matrix of the presence (1)/absence (0) of each shown gene was used as an input for grouping using the Manhattan and UPGMA methods for the calculation of distances and the generation of the grouping pattern, respectively. See Section 4 for details.

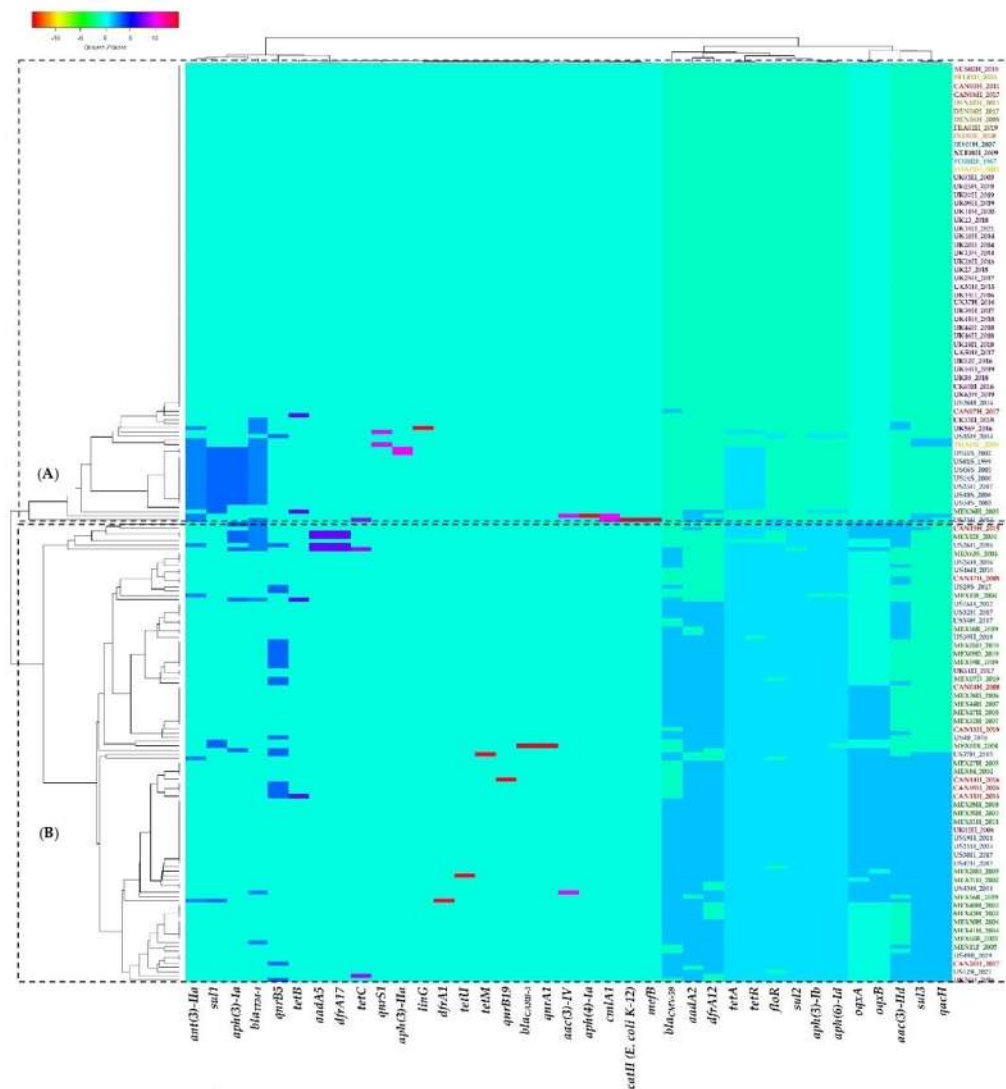


Figure 6. Grouping pattern by strain and resistance gene identified in the genomes of the ST213 strains analyzed in this work. A binary matrix of presence (1)/absence (0) of each shown gene was used as an input for grouping using the Manhattan and UPGMA methods for the calculation of distances and the generation of the grouping pattern, respectively. See Section 4 for details. (A) Grouping pattern of genome/strain from UK strains along with two Canadian ge-nomes and all the European, Asian, and Australian samples; (B) Grouping pattern of ge-nome/strain from the three North American countries, and only three UK. Country symbols: **AUS**, Australia; **BEL**, Belgium; **CAN**, Canada; **DEN**, Denmark; **FRA**, France; **IND**, India; **IRE**, Ireland; **MEX**, Mexico; **NET**, Netherlands; **POR**, Portugal; **THA**, Thailand; **UK**, United Kingdom; **US**, United States of America.

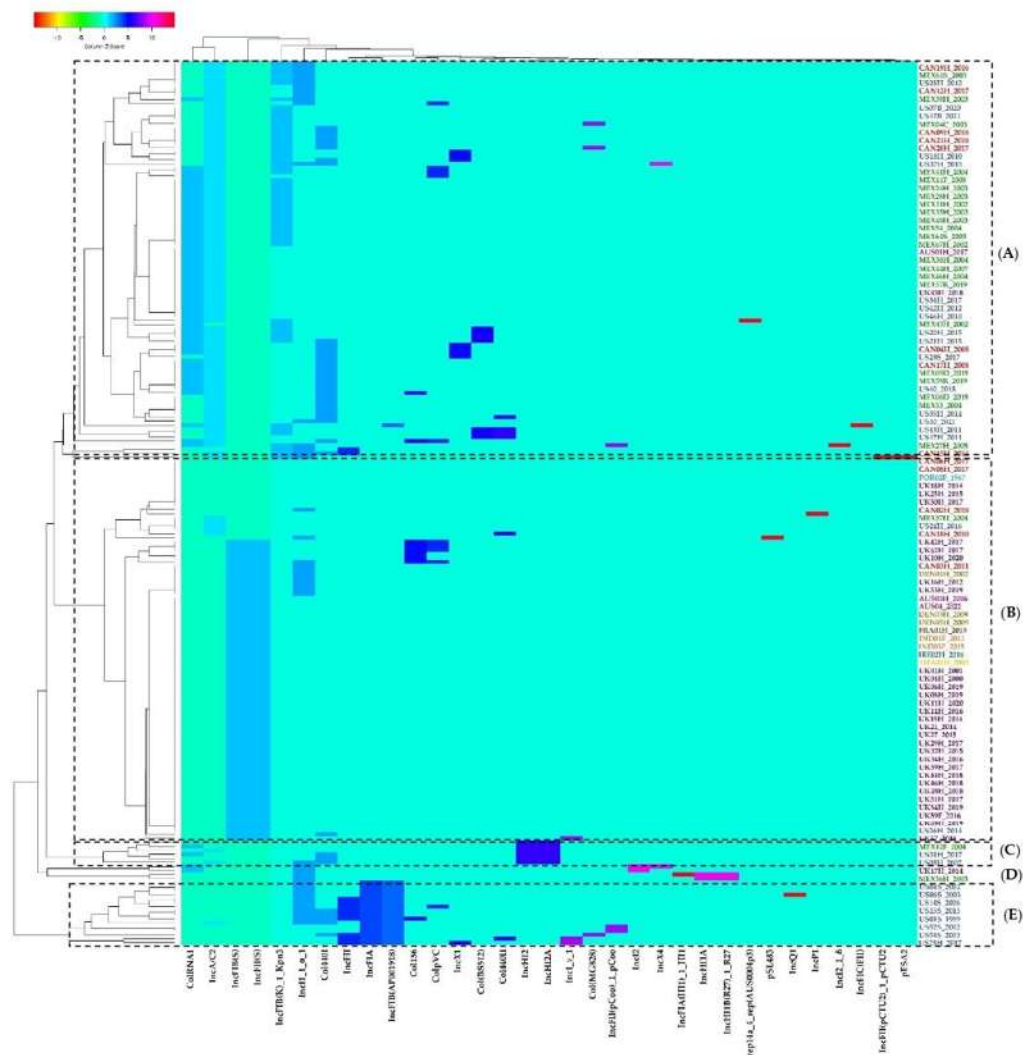


Figure 7. Grouping pattern by strain and plasmid presence/absence in the genomes of the ST123 strains analyzed in this work. A binary matrix of presence (1)/absence (0) of each shown plasmid was used as an input for grouping with the Manhattan and UPGMA methods for the calculation of distances and the generation of the grouping pattern, respectively. See Section 4 for details. (A) Grouping pattern of genome/strain from UK and one from Australia; (B) Grouping pattern of genome/strain European, Asian, and Australian, with five samples from Canada, one from Mexico, and one from the USA; (C) Grouping pattern of genome/strain from Mexico; (D) Grouping pattern of genome/strain from the USA; (E) Grouping pattern of genome/strain from the UK. Country symbols: AUS, Australia; BEL, Belgium; CAN, Canada; DEN, Denmark; FRA, France; IND, India; IRE, Ireland; MEX, Mexico; NET, Netherlands; POR, Portugal; THA, Thailand; UK, United Kingdom; US, United States of America.

3. Discussion

In the present work, the intragenotypic variability of *S. Typhimurium* ST213 strains in relation to the presence of genes associated with antibiotic resistance was evaluated by means of comparative genomic analysis. In the same way, this variation was documented in relation to the country and the type of sample of origin of the strains whose genomes were analyzed. Previous analyses related to the distribution of *S. enterica* strains in different countries and sample types, as well as the variability in the distribution of genetic determinants of antibiotic resistance, have focused mainly on evaluating the differences between serotypes or within the same serotype, as shown by several recent reviews on the subject [2,8,24,39,40]. Epidemiological studies documenting genomic variation associated with antibiotic resistance at a more subtle level, such as within the same *S. enterica* ST genotype, despite having been performed increasingly more frequently in recent years [29,41–43], are still relatively scarce. In this sense, the description of the variation in the resistance genes of *S. Typhimurium* strains of the ST213 genotype that causes systemic infection in Africa stands out, with differences having been observed in the phenotypic pattern of resistance to antibiotics associated with both the presence of the plasmid named pSLT-BT as well as with the composition of genes within it [21,29]. Similarly, strains of the emerging genotype ST34 present different patterns of resistance to antibiotics and show variation in the presence of genetic determinants of resistance [31,43]. As far as we have been able to document, these are the cases in which intragenotypic differences have been established in the epidemiology and patterns of antibiotic resistance in *S. enterica* in emergent/re-emergent STs replacing the ancestral ST19 genotype.

The emerging ST213 genotype was reported in Mexico to be associated with a process of displacement of the ST19 genotype [44], considered to be the founder within the *Typhimurium* serotype. The process of genome retrieval from public databases of strains of the ST213 genotype carried out here shows that this genotype is now frequently isolated in North America (Canada, Mexico, USA) and has recently spread to Europe, Asia, and Oceania, which is why it may represent a global public health problem as an emerging/re-emerging genotype.

It is noteworthy that six of the ST213 genomes retrieved from the databases belong to stored strains isolated before this century, with the oldest one in the USA dating back to 1957. This finding clearly shows that ST213 genotype was present long before its detection as an emerging public health concern in Mexico, replacing the founder ST19 genotype [44]. Additionally, the genomes retrieved indicate that ST213 strains have been widely dispersed throughout the North America region (Canada, Mexico, USA) since the beginning of this century. Furthermore, despite its presence in Europe (specifically Portugal) since 1965, strains of the ST213 genotype began to be frequently recovered from clinical and food samples at the beginning of this century, particularly in the United Kingdom, but also reached Thailand at the same time. The isolation year of ST213 strains whose genomes were analyzed here suggests its recent dispersion to India and Australia.

The fast spread of strains of the ST213 genotype in North America makes sense, given the geographical proximity and the constant flow of people and food between the three countries of this region [45–47]. Despite the need for a detailed epidemiological analysis, the years of isolation of the ST213 strains analyzed here suggest a dispersion route since its emergence and detection in Mexico. The available data strongly suggest that despite their global presence of at least 65 years, the ST213 strains have only recently become a public health issue because of its emergence in Mexico and/or the USA. The grouping presence/absence patterns of plasmids and resistance genes indicate that ST213 reached the UK from the USA and, from this country, spread to the rest of Europe, Asia, and Oceania. It is plausible that the ST213 genotype dispersed from the USA to the UK and, from there, to the rest of Europe, Asia, and Oceania through a traveler, rather than food or a vehicle. The traveler income/outcome of multi-resistant *S. enterica* strains of different serotypes has recently been documented in the regions and countries involved in the present analysis [48–52]. As previously stated, this epidemiological pattern is a

hypothesis that emerged from the results obtained here and deserves further genomic epidemiological analysis.

The grouping pattern generated based on the sample of isolated strains whose genomes were analyzed here indicates that human strains possess a particular set of antibiotic resistance genetic determinants. However, the determinant genetics of antibiotic resistance from human samples share a bigger clade with animal and meat (food) samples. Thus, such a grouping pattern suggests that ST213 human strains are mainly acquired from farm animals and food and/or interchange some genetic subset(s) with strains from these sources. This hypothesis is consistent with reports of the frequent zoonotic transmission of non-invasive Typhimurium serotype strains in Mexico [32,53], Canada [54,55], and the United States [56,57], the three North American countries, which contributed the greatest number of strains to this study. Furthermore, in the zoonotic reports from these three countries, the transmission of strains of *S. enterica* from pigs, cattle, and poultry to humans is common, and these are the species samples whose genomes were analyzed in this work.

All antibiotic resistance genes detected in the ST213 strains genomes analyzed were predominantly relevant in the North American countries. In the same way, all the resistance genes/mutations were present predominantly in human samples. Both regional and sample type predominancies can be partially explained by the overrepresentation of genomes from strains at regional and sample levels. Furthermore, Mexico or North America are the probable origin of the ST213 as an emergent/reemergent pathogen of global health relevance. Thus, the discussion highlights results for North America and the human ST213 genomes. The ST213 genomes harbor a great diversity of genetic determinants for antibiotic resistance, and the gene/mutations/plasmid replicon combinations per genome are also diverse. The genetic determinants to resistance against quinolones and aminoglycosides are relevant because the World Health Organization classifies them as critically important antimicrobials which are the “Sole, or one of limited available therapies, to treat serious bacterial infections in people”, along with other relevant criteria [58].

The *qnr* and *oqxAB* genes associated with quinolone resistance are mainly related to plasmids [59,60]. Despite being found in other serotypes in Mexico, the *qnr* genes were absent in Typhimurium strains of animal origin [61,62], but present in Mexican human strains of this serotype [63]. The *oqxAB* genes found here have also been previously reported for several serotypes of human isolates in Mexico [61,62]. Resistance to quinolones is considered low for *S. enterica* strains in the USA, although in this country it has been documented the presence of genes conferring resistance to such antimicrobial compounds in the serotype Typhimurium strains coming from clinical, pork meat, and livestock samples [64–67]. In contrast, in the case of Canada, the *qnrB* and *qnrS* genes were recently reported in ciprofloxacin-resistant human clinical strains of different serotypes of *S. enterica*, including Typhimurium, and the *oqxAB* gene has rarely been found [68]. Regarding the five point mutations that occur in the quinolone resistance-determining regions (QRDR) of DNA gyrase (*gyrA*) and topoisomerase IV (*parC*) [60] found in the genomes of ST213 strains, the double mutant S83Y in *gyrA* and S80I in *parC* is interesting, since *S. Typhimurium* mutations in *gyrA*, in addition to playing a dominant role in resistance to fluoroquinolones, have a synergistic effect with other resistance mechanisms, while the S80I mutation in *parC* appears to have no effect on quinolone resistance without *gyrA* mutations [69]. Whereas QRDR mutations are frequent in bovine *S. enterica* isolated strains of different serotypes in Mexico [62] and Canada [70], it appears to be absent or to occur with low frequency in the USA [36,71].

In relation to aminoglycoside resistance, the ST213 genomes carry the genes coding for the three types of modifying enzymes [72]. However, the CLSI has cautioned that aminoglycosides are not clinically effective against *S. enterica*, with this species being relevant as a carrier and potentially a means of transfer to other pathogenic bacteria [73]. The transference of genomic island one of *S. enterica* to *Escherichia coli*, a mobilizable element that carries multiple resistance antibiotics genes, has been experimentally demonstrated [74]. It has been documented that gentamicin resistance has increased significantly in the strains

of eight serovars in human and retail meat in Canada in the last few decades [75]. Around 50% of Typhimurium strains from different sources from Mexico now show gentamicin resistance [32]. Additionally, aminoglycoside resistance genes are highly prevalent in *S. enterica* strains isolated from farm animals in the USA, showing the geographical variations in its incidence [76].

In the case of tetracycline, sulfonamides, and phenicols, these antibiotics are considered by the WHO in the category of highly important antimicrobials, fulfilling the same first criterion of the previous antimicrobials but not adding more criteria [58]. The six tetracycline resistance genes detected in the ST213 strains are related to two resistance mechanisms, efflux pumps and ribosomal protection [77]. Regarding the sulfonamide resistance genes, the ST213 genome carries three of the four resistance genes associated with dihydropteroate synthetase modifications [78]. Interestingly, *sul2* and *sul3* predominate over the most frequently reported *sul1*. Additionally, the genomes carry three modifications of the dihydrofolate reductase enzyme for resistance to trimethoprim, of which *dfrA12* predominates. Although three genes that confer resistance to phenicols in the ST213 genomes are also present, the most widely distributed is the efflux bomb-coding gene *floR*. The strains of the Typhimurium serotype isolated from different sources show high percentages of resistance to these three types of antibiotics [32].

Besides all the previously commented resistance genes, all the analyzed genomes harbor *aac(6′)-Iaa*, *mdsA*, *mdsB*, *mdsC*, *golS*, *sdiA*, and the majority carried the *qacH* gene. The *aac(6′)-Iaa* gene for aminoglycosides resistance resides in the chromosome of Typhimurium strains and is present in the ancestral ST19 genotype [79]. The genes *mdsA*, *mdsB*, and *mdsC* code for the transporter efflux pump *mdsABC* *golS*, a promoter that is related to resistance to novobiocin [80]. And it is also present in the ST19 genotype [81]. The *sdiA* gene codes for a quorum-sensing regulator that mediates the multi-drug resistance AcrAB efflux pump [82], the overproduction of which confers multidrug resistance; it is also present in the ST19 genotype. Finally, the *qacH* gene codes for an efflux bomb that confers resistance to the quaternary ammonium compounds, commonly used organic disinfectants [83]. This last gene is mainly found in different types of mobile genetic elements and confers resistance to aminoglycosides, chloramphenicol, erythromycin, and tetracyclines. As a whole, these antecedents suggest that such common ST213 genes are ancestral characters present in the ST19 genotype that can confer antibiotic multi-resistance to both genotypes.

All the antibiotics mentioned above are relevant for their use in veterinary and human medicine [58,84]. The samples of isolation of the ST213 strains for which genomes were analyzed here were predominantly from human and farm animals. This suggests that both farms and hospitals are relevant reservoirs for *S. enterica* ST213 strains carrying resistance genes that can be transferred to other pathogenic bacteria or directly to humans [85]. The diversity and distribution of the genes/mutations found in the analyzed genomes suggest that most of the North American ST213 strains are phenotypically multi-resistant to antibiotics.

In this work, 33 different plasmids were bioinformatically identified in the genomes of ST213 strains from around the world. Inc-type plasmids were found in 207 strains, while Col-type plasmids in 103; pESA2, pSL483 and rep14a_4_rep were found in a single strain each. The genomes of *S. enterica* North American ST123 strains from the US, Mexico, and Canada harbor 32 of the 33 plasmids, in contrast to the reduced variation in genomes of strains from Europe, but the low number of ST213 strains from Asia and Australia makes comparison difficult within these regions.

The Inc (C, F, H, I1) conjugative plasmids found in the analyzed genomes are frequently reported in different *S. enterica* serotypes, including Typhimurium, which together carry genes for all kind of antibiotics, some of which can be within an integron [37,38]. The simultaneous presence of IncHI2/IncHI2A and IncFIB(S)/IncFII(S) plasmids in the same ST213 genomes has previously been observed in *S. enterica* strains from Asia [86], Europe [87], and South America [88] for the first pair and in Africa for the second [89]. In addition, the IncHI2/IncHI2A pair was only found in the genomes of North American strains, while

the presence of the IncFIB(S)/IncFII(S) pair was predominant in European strains. The plasmids IncI2 [90], ColpVC, IncHI2/IncHI2A, IncFIA, IncH1A, IncFIA(HI1)_1_HI1 [88,91], and ColRNAI, IncFIB(S)/IncFII(S) [41,92] have already been reported in strains of the ST19 founder genotype. The Col and IncX plasmids were present but less frequent in the ST213 genomes analyzed. The Col plasmids are mainly associated with the spread of *qnrS1* and *qnrB19* [37], and specifically the ColpVC detected here is associated with *aph(3'')-Ia* in bovine strains [93]. The IncX plasmids have been mainly isolated from human and animal samples and mainly encode genetic determinants against extended-spectrum β -lactams and quinolones [37,38].

The presence of the replicon rep14a_4_rep(AUS0004p3) is surprising because this plasmid belongs to a three-membered family of small mobilizable plasmids only described in the Gram-positive species *Enterococcus faecium*; thus, it must be considered to have a narrow host range [94]. Furthermore, the presence of these plasmids in *E. faecium* is associated with tetracycline resistance in strains isolated from human clinical samples, and it has been stated that such plasmids cannot be transferred by conjugation. This intriguing finding indicates the existence of a horizontal gene transfer (HGT) mechanism between *E. faecium* and *S. enterica*, which, to the best of our knowledge, has not previously been suggested. Further data on the plasmid sequence are needed to corroborate this result, and it will be relevant to analyze the HGT mechanism between the involved species.

The diversity of plasmid replicons found in the ST213 genomes indicates that such genotypes can be prone to the horizontal gene transfer (HGT) of antibiotic resistance genes. The plasmid diversity and distribution in the genomes analyzed here indicates that the plasmid interchange in ST213 strains features different dynamics between North America and Europe, apparently being more dynamic in the former region. Several plasmid replicons were found in the genomes of ST213 strains from all types of samples but showed different rates of incidence. However, most plasmids are present in samples related to the well-established zoonotic/food transmission chains of *S. enterica* to humans. Further work is needed to analyze a possible positive relationship between the type of sample and the presence/absence of a particular type of plasmid. Additionally, it is important that further studies define whether there is any significant relationship between the presence of these plasmids and the geographical region of origin of the ST213 strains, as well as its public health consequences.

It is important to consider that one of the weaknesses of the present study is that the analyzed genomes did not come from a systematic program based on the random sampling of strains. All ST213 genotype genomes available in public databases, of good quality, and with adequate metadata were analyzed. Thus, the trends and rates of prevalence reported here are the result of various factors, including the study of specific outbreaks by country as well as the capacity for genomic sequencing and its use as an epidemiological surveillance tool in different countries. The effect of these variables is reflected in the number of genomes of the ST213 genotype reported by year and by country (Figure 3), where the prevalence of genomes of strains from the USA, the UK, and other European countries, as well as from Australia, can be observed. Some of these countries routinely use genome sequencing in outbreak analyses and have adopted such strategies as the standard for the epidemiological surveillance of *S. enterica* or are in the process of doing so [95–99].

Another factor that may influence the results of the analysis carried out here is the quality of the sequences used, since low-level contamination can affect the detection of antibiotic resistance genes and point mutations associated with resistance [100]. However, the assembled genomes of Enterobase undergo a quality control process that excludes the effects of such contamination [35], and the sets of reads used were filtered with bioinformatic tools to remove those that did not meet appropriate quality standards. Furthermore, it has been documented that the bioinformatic analysis of WGS to predict antibiotic resistance in *S. enterica* can generate results inconsistent with the observed phenotypic resistance [101]. However, in such works, only the ResFinder 3.2.0 tool is used for the location of antibiotic resistance genes, in contrast to the use of this software together with the ARG-ANNOT

and CARD tools here to aid in locating the genetic determinants of antibiotic resistance, along with the use of databases recently curated to include genes and mutations previously not included in ResFinder [96–98]. In addition, the ResFinder update makes it possible to determine the number of copies of genes associated with resistance [102], another factor in antibiotic resistance that has previously not been considered by bioinformatics packages in resistance determination. Despite the predictive power of this bioinformatic analysis, it was desirable to contrast the results obtained here with the phenotypic antibiotic resistance/susceptibility data in order to obtain a clearer picture of the public health relevance of the ST213 genotype.

4. Materials and Methods

4.1. Data Retrieval

A total of 286 sets (572 reads pairs clusters) of Illumina sequencing reads available in EMBL's European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk/>, accessed on 1 July 2022) and 33 Enterobase assembled genomes (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>, accessed on 1 July 2022) [35,103,104] assigned to ST213 genotype strains of *Salmonella enterica* were retrieved. All read sets and assembled genomes retrieved were filtered for a quality assessment to exclude duplicates, remove low-quality reads, and sampling coverage (Figure 8). Additionally, reads/genomes for which relevant metadata (country of isolation, year of isolation, sample kind) were not available were discarded. After filtering (see Section 4.2 below), 188 read sets and 32 assembled genomes were deemed to be adequate for analysis (Supplementary Table S1).

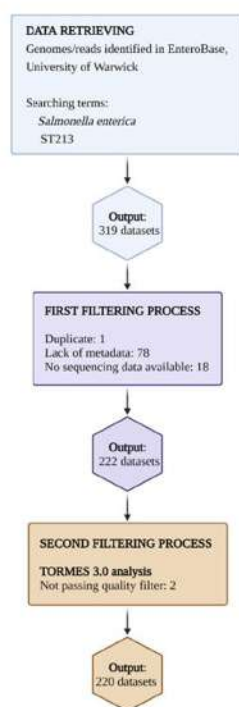


Figure 8. Data retrieval and exclusion criteria used for the analyzed genomes. The flowchart shows the number of genomes of read datasets initially found in Enterobase and after the filtering criteria

were applied. Each filtering criterion shows the number of genomes/reads excluded. The metadata considered to include a genome/reads dataset were country of precedence, type of sample, and year of isolation. For details on the analyzed genomes, see Supplementary Tables S1–S3. For quality filter analysis, see the main text (figure created with [Biorender.com](https://biorender.com), accessed on 1 July 2022).

4.2. Bioinformatic Analysis

The 188 sets of sequencing reads and 32 assembled genomes were processed with TORMES 3.0 [105] for sequence quality filtering, de novo genome assembly, and antibiotic resistance gene screening. All the genomes used in this analysis were at the level of *draft* genomes. The quality parameters used in the bioinformatic filtering to select both the genomes obtained from Enterobase (Supplementary Table S2) and for the genomes assembled in this work (Supplementary Table S3) were a high value of N50, an average length of contigs of greater than 5000 bases, and a low number of *contigs* [106]. Additionally, the genome length obtained was in agreement with the genome length of different serotypes of *Salmonella enterica*, including Typhimurium [107]. Regarding the number of contigs, the mean of the assemblies obtained from the Enterobase was 73, while the mean for the assemblies carried out in this work was 89. This allowed us to ensure an adequate quality of the assemblies used for the gene search analysis and identification.

The identification of antibiotic resistance genes in the genomes of interest was carried out using ARG-ANNOT [108], CARD [109,110], and ResFinder 3.2.0 [111]. The PlasmidFinder tool [112] was used for the identification of plasmid replicons and PointFinder 3.1.0 for mutations in antibiotic resistance genes [113]. Gene nomenclature used here is provided by CARD.

4.3. Data Analysis

Binary (1,0) matrices were constructed to represent the presence (1)/absence (0) of resistance genes or plasmids, as appropriate. The genes/plasmids present in the genomes of all tested strains were excluded from this analysis. Both matrices were analyzed in the Heatmapper server [114] with the parameters of the Manhattan and UPGMA criteria for the calculation of distances and the generation of the grouping pattern, respectively. Manhattan distances were calculated based on the presence/absence of 37 identified antibiotic resistance genes, excluding seven genes that were present in 100% of the analyzed genomes (see Table 1). Additionally, those strains lacking all the genes/plasmids were excluded from this analysis.

5. Conclusions

The replacement of the ST19 genotype by other genotypes in different countries represents a serious public health concern worldwide because of the virulence and multiple antibiotic resistance of these emergent genotypes. Thus, the fast increase in the number of genomes deposited in public databases belonging to strains of the ST213 genotype throughout the world is a signal of the need to study this multiple-antibiotic-resistant and virulent *S. Typhimurium* variant. The great number of antibiotic resistance genes and plasmid replicons carried by ST213 strains and its simultaneous presence in the same genome indicates that most of them present a multiple antibiotic resistance phenotype and are prone to the HGT of antibiotic resistance determinants. Additionally, the genomes and grouping patterns obtained here suggest a route of dispersion of the ST213 emergent genotype beginning in North America (Canada, Mexico, USA) and moving to the United Kingdom, with further dispersion occurring from here to the rest of Europe and simultaneously to Asia and Oceania. Further detailed epidemiological analysis is necessary in order to clarify this dispersion hypothesis and to understand the mechanisms associated with the differences in the pattern of the presence/absence of antimicrobial resistance genetic determinants by the geographical origin of the strains and the type of sample of precedence.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11070925/s1>. Supplementary Tables S1–S3: Data of the genomes analyzed in the present work.

Author Contributions: Conceptualization, G.V.-M. and M.S.V.-G.; methodology, E.A.H.-D. and A.M.N.-P.; formal analysis, E.A.H.-D. and A.M.N.-P.; investigation, G.V.-M. and M.S.V.-G.; resources, G.V.-M. and M.S.V.-G.; data curation, E.A.H.-D. and A.M.N.-P.; writing—original draft preparation, G.V.-M. and M.S.V.-G.; writing—review and editing, G.V.-M. and E.A.H.-D.; funding acquisition, G.V.-M. and M.S.V.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica UMSNH, 2022 Research Program.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is available in the supplementary materials.

Acknowledgments: Thanks is given to CONACYT for the graduate scholarship granted to E.A.H.-D. (No. 731999). We also acknowledge Elisa Vázquez-Vázquez for her support in translating this manuscript into English and editing it.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Alby, K.; Nachamkin, I. Gastrointestinal infections. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 44. [CrossRef] [PubMed]
- Eng, S.K.; Pusparajah, P.; Ab Mutalib, N.S.; Ser, H.L.; Chan, K.G.; Lee, L.H. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* **2015**, *8*, 284–293. [CrossRef]
- Mafi, N.; Orenstein, R. *Salmonella*. In *Encyclopedia of Gastroenterology*, 2nd ed.; Johnson, L.R., Ed.; Elsevier: New York, NY, USA, 2020; pp. 384–391. [CrossRef]
- St John-Brooks, R. The Genus *Salmonella* Lignieres, 1900: Issued by the *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology. *J. Hyg.* **1934**, *34*, 333–350.
- Grimont, P.A.; Weill, F.X. *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 9th ed.; WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*; WHO: Paris, France, 2007; Volume 9, pp. 1–166.
- Issenhuth-Jeanjean, S.; Roggentin, P.; Mikoleit, M.; Guibourdenche, M.; De Pinna, E.; Nair, S.; Fields, I.P.; Weill, F.X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the white–Kauffmann–Le minor scheme. *Res. Microbiol.* **2014**, *165*, 526–530. [CrossRef] [PubMed]
- Hendriksen, R.S.; Vieira, A.R.; Karlsmose, S.; Lo Fo Wong, D.M.; Jensen, A.B.; Wegener, H.C.; Aarestrup, F.M. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 887–900. [CrossRef] [PubMed]
- Ferrari, R.G.; Rosario, D.K.; Cunha-Neto, A.; Mano, S.B.; Figueiredo, E.E.; Conte-Junior, C.A. Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: A meta-analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e00591–19. [CrossRef]
- Inns, T.; Ashton, P.M.; Herrera-Leon, S.; Lighthill, J.; Foulkes, S.; Jombart, T.; Rehman, Y.; Fox, A.; Dallman, T.; de Pinna, E.; et al. Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 289–298. [CrossRef] [PubMed]
- Leekitcharoenphon, P.; Nielsen, E.M.; Kaas, R.S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87991. [CrossRef] [PubMed]
- Simon, S.; Trost, E.; Bender, J.; Fuchs, S.; Malorny, B.; Rabsch, W.; Prager, R.; Tietze, E.; Flieger, A. Evaluation of WGS based approaches for investigating a food-borne outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Derby in Germany. *Food Microbiol.* **2018**, *71*, 46–54. [CrossRef]
- Deng, X.; den Bakker, H.C.; Hendriksen, R.S. Genomic epidemiology: Whole-genome-sequencing-powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2016**, *7*, 353–374. [CrossRef]
- Tang, P.; Croxen, M.A.; Hasan, M.R.; Hsiao, W.W.; Hoang, L.M. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *Am. J. Infect. Control.* **2017**, *45*, 170–179. [CrossRef] [PubMed]
- Rantsiou, K.; Kathariou, S.; Winkler, A.; Skandamis, P.; Saint-Cyr, M.J.; Rouzeau-Szynalski, K.; Amézquita, A. Next generation microbiological risk assessment: Opportunities of whole genome sequencing (WGS) for foodborne pathogen surveillance, source tracking and risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**, *287*, 3–9. [CrossRef] [PubMed]
- Achtman, M.; Wain, J.; Weill, F.X.; Nair, S.; Zhou, Z.; Sangal, V.; Krauland, M.G.; Hale, J.L.; Harbottle, H.; Uesbeck, A.; et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1009040. [CrossRef]

16. Lan, R.; Reeves, P.R.; Octavia, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 996–1005. [CrossRef] [PubMed]
17. Feijao, P.; Yao, H.T.; Fornika, D.; Gardy, J.; Hsiao, W.; Chauve, C.; Chindelevitch, L. MentaLiST—A fast MLST caller for large MLST schemes. *Microb. Genom.* **2018**, *4*, e000146. [CrossRef] [PubMed]
18. Alba, P.; Leekitcharoenphon, P.; Carfora, V.; Amoroso, R.; Cordaro, G.; Di Matteo, P.; Ianzano, A.; Iurescia, M.; Diaconu, E.L.; ENGAGE-EURL-AR Network Study Group; et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: Insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microb. Genomics.* **2020**, *6*, e000365. [CrossRef] [PubMed]
19. Bonifait, L.; Thépault, A.; Baugé, L.; Rouxel, S.; Le Gall, F.; Chemaly, M. Occurrence of *Salmonella* in the cattle production in France. *Microorganisms* **2021**, *9*, 872. [CrossRef]
20. Ashton, P.M.; Owen, S.V.; Kaindama, L.; Rowe, W.P.; Lane, C.R.; Larkin, L.; Nair, S.; Jenkins, C.; de Pinna, E.M.; Feasey, N.A.; et al. Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome Med.* **2017**, *9*, 92. [CrossRef]
21. Kingsley, R.A.; Msefula, C.L.; Thomson, N.R.; Kariuki, S.; Holt, K.E.; Gordon, M.A.; Harris, D.; Clarke, L.; Whitehead, S.; Sangal, V.; et al. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Res.* **2009**, *19*, 2279–2287. [CrossRef] [PubMed]
22. Okoro, C.K.; Barquist, L.; Connor, T.R.; Harris, S.R.; Clare, S.; Stevens, M.P.; Arends, M.J.; Hale, C.; Kane, L.; Pickard, D.J.; et al. Signatures of adaptation in human invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 populations from sub-Saharan Africa. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003611. [CrossRef]
23. Hammarlöf, D.L.; Kröger, C.; Owen, S.V.; Canals, R.; Lacharme-Lora, L.; Wenner, N.; Schager, A.E.; Wells, T.J.; Henderson, I.R.; Wigley, P.; et al. Role of a single noncoding nucleotide in the evolution of an epidemic African clade of *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E2614–E2623. [CrossRef] [PubMed]
24. Neuert, S.; Nair, S.; Day, M.R.; Doumith, M.; Ashton, P.M.; Mellor, K.C.; Jenkins, C.; Hopkins, K.L.; Woodford, N.; de Pinna, E.; et al. Prediction of phenotypic antimicrobial resistance profiles from whole genome sequences of non-typhoidal *Salmonella enterica*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 592. [CrossRef]
25. Tassinari, E.; Bawn, M.; Thilliez, G.; Charity, O.; Acton, L.; Kirkwood, M.; Petrovska, L.; Dallman, T.; Burgess, C.M.; Hall, N.; et al. Whole-genome epidemiology links phage-mediated acquisition of a virulence gene to the clonal expansion of a pandemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clone. *Microb. Genom.* **2020**, *6*, mgen000456. [CrossRef]
26. Crouse, A.; Schramm, C.; Emond-Rheault, J.G.; Herod, A.; Kerhoas, M.; Rohde, J.; Gruenheid, S.; Kukavica-Ibrulj, I.; Boyle, B.; Greenwood, C.M.T.; et al. Combining Whole-Genome Sequencing and multimodel phenotyping to identify genetic predictors of *Salmonella* virulence. *mSphere* **2020**, *5*, e00293-20. [CrossRef] [PubMed]
27. Pires, J.; Huisman, J.S.; Bonhoeffer, S.; Van Boeckel, T.P. Multidrug resistance dynamics in *Salmonella* in food animals in the United States: An analysis of genomes from public databases. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e00495-21. [CrossRef] [PubMed]
28. Yin, X.; Fu, Y.; Tate, H.; Pinto, C.; Dudley, E.G.; M'ikanatha, N.M. Genomic analysis of *Salmonella* Typhimurium from humans and food sources accurately predicts phenotypic multi-drug resistance. *Food Microbiol.* **2022**, *103*, 103957. [CrossRef] [PubMed]
29. Okoro, C.K.; Kingsley, R.A.; Connor, T.R.; Harris, S.R.; Parry, C.M.; Al-Mashhadani, M.N.; Kariuki, S.; Msefula, C.L.; Gordon, M.A.; de Pinna, E.; et al. Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1215–1221. [CrossRef] [PubMed]
30. Wong, M.H.Y.; Yan, M.; Chan, E.W.C.; Liu, L.Z.; Kan, B.; Chen, S. Expansion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST34 clone carrying multiple resistance determinants in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 4599–4601. [CrossRef] [PubMed]
31. Sun, J.; Ke, B.; Huang, Y.; He, D.; Li, X.; Liang, Z.; Ke, C. The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113145. [CrossRef] [PubMed]
32. Zaidi, M.B.; Calva, J.J.; Estrada-Garcia, M.T.; Leon, V.; Vazquez, G.; Figueroa, G.; Lopez, E.; Contreras, J.; Abbott, J.; Zhao, S.; et al. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 429–435. [CrossRef] [PubMed]
33. Ambrose, S.J.; Harmer, C.J.; Hall, R.M. Compatibility and entry exclusion of IncA and IncC plasmids revisited: IncA and IncC plasmids are compatible. *Plasmid* **2018**, *96–97*, 7–12. [CrossRef] [PubMed]
34. Wiesner, M.; Calva, E.; Fernández-Mora, M.; Cevallos, M.A.; Campos, F.; Zaidi, M.B.; Silva, C. *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 9. [CrossRef] [PubMed]
35. Enterobase. Quality Assessment Evaluation—Enterobase Documentation. 2018. Available online: <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/pipelines/backend-pipeline-qaevaluation.html> (accessed on 31 January 2022).
36. Lee, K.Y.; Atwill, E.R.; Pitesky, M.; Huang, A.; Lavelle, K.; Rickard, M.; Shafii, M.; Hung-Fan, M.; Li, X. Antimicrobial resistance profiles of non-typhoidal *Salmonella* from retail meat products in California, 2018. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 835699. [CrossRef] [PubMed]
37. Rozwandowicz, M.; Brouwer MS, M.; Fischer, J.; Wagenaar, J.A.; Gonzalez-Zorn, B.; Guerra, B.; Mevius, D.J.; Hordijk, J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1121–1137. [CrossRef] [PubMed]
38. McMillan, E.A.; Jackson, C.R.; Frye, J.G. Transferable plasmids of *Salmonella enterica* associated with antibiotic resistance genes. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 562181. [CrossRef]

39. Lima, T.; Domingues, S.; Da Silva, G.J. Plasmid-mediated colistin resistance in *Salmonella enterica*: A review. *Microorganisms* **2019**, *7*, 55. [CrossRef] [PubMed]
40. Portes, A.B.; Rodrigues, G.; Leitão, M.P.; Ferrari, R.; Conte Junior, C.A.; Panzenhagen, P. Global distribution of plasmid-mediated colistin resistance *mcr* gene in *Salmonella*: A systematic review. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 872–889. [CrossRef]
41. Jain, P.; Sudhanthirakodi, S.; Chowdhury, G.; Joshi, S.; Anandan, S.; Ray, U.; Mukhopadhyay, A.; Dutta, S. Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207954. [CrossRef]
42. Elnekave, E.; Hong, S.L.; Lim, S.; Boxrud, D.; Rovira, A.; Mather, A.E.; Perez, A.; Alvarez, J. Transmission of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* 4,[5], 12: I- Sequence Type 34 between Europe and the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 3034–3038. [CrossRef] [PubMed]
43. Mather, A.E.; Phuong TL, T.; Gao, Y.; Clare, S.; Mukhopadhyay, S.; Goulding, D.A.; Hoang, N.T.D.; Tuyen, H.T.; Lan NP, H.; Thompson, C.N.; et al. New variant of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium associated with invasive disease in immunocompromised patients in Vietnam. *mBio* **2018**, *9*, e01056-18. [CrossRef]
44. Wiesner, M.; Zaidi, M.B.; Calva, E.; Fernández-Mora, M.; Calva, J.J.; Silva, C. Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 131. [CrossRef] [PubMed]
45. Holley, R.A. Food safety challenges within North American free trade agreement (NAFTA) partners. *Compr. Rev. Food Sci.* **2011**, *10*, 131–142. [CrossRef]
46. Johnson, L.R.; Gould, L.H.; Dunn, J.R.; Berkelman, R.; Mahon, B.E.; The FoodNet Travel Working Group. *Salmonella* infections associated with international travel: A Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) study. *Foodborne Pathog. Dis.* **2011**, *8*, 1031–1037. [CrossRef]
47. Tighe, M.K.; Savage, R.; Vrbova, L.; Toolan, M.; Whitfield, Y.; Varga, C.; Lee, B.; Allen, V.; Maki, A.; Walton, R.; et al. The epidemiology of travel-related *Salmonella* Enteritidis in Ontario, Canada, 2010–2011. *BMC Public Health* **2012**, *12*, 310. [CrossRef] [PubMed]
48. Coipan, C.E.; Westrell, T.; van Hoek, A.H.; Alm, E.; Kotila, S.; Berbers, B.; de Keersmaecker, S.C.J.; Ceyssens, P.J.; Borg, M.L.; Chattaway, M.; et al. Genomic epidemiology of emerging ESBL-producing *Salmonella* Kentucky bla CTX-M-14b in Europe. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 2124–2135. [CrossRef] [PubMed]
49. Waldram, A.; Dolan, G.; Ashton, P.M.; Jenkins, C.; Dallman, T.J. Epidemiological analysis of *Salmonella* clusters identified by whole genome sequencing, England and Wales 2014. *Food Microbiol.* **2018**, *71*, 39–45. [CrossRef] [PubMed]
50. Williamson, D.A.; Lane, C.R.; Easton, M.; Valcanis, M.; Strachan, J.; Veitch, M.G.; Kirk, M.D.; Howden, B.P. Increasing antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolates in Australia from 1979 to 2015. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02012–e02017. [CrossRef] [PubMed]
51. Medalla, F.; Gu, W.; Friedman, C.R.; Judd, M.; Folster, J.; Griffin, P.M.; Hoekstra, R.M. Increased incidence of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections, United States, 2004–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1662. [CrossRef]
52. Varga, C.; John, P.; Cooke, M.; Majowicz, S.E. Spatial and space-time clustering and demographic characteristics of human nontyphoidal *Salmonella* infections with major serotypes in Toronto, Canada. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0235291. [CrossRef]
53. Zaidi, M.B.; Campos, F.D.; Estrada-García, T.; Gutierrez, F.; León, M.; Chim, R.; Calva, J.J. Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, 51–60. [CrossRef]
54. Parmley, E.J.; Pintar, K.; Majowicz, S.; Avery, B.; Cook, A.; Jokinen, C.; Gannon, V.; Lapen, D.R.; Topp, E.; Edge, T.A.; et al. A Canadian application of One Health: Integration of *Salmonella* data from various Canadian surveillance programs (2005–2010). *Foodborne Pathog. Dis.* **2013**, *10*, 747–756. [CrossRef] [PubMed]
55. Flockhart, L.; Pintar, K.; Cook, A.; McEwen, S.; Friendship, R.; Kelton, D.; Pollari, F. Distribution of *Salmonella* in humans, production animal operations and a watershed in a FoodNet Canada sentinel site. *Zoonoses Public Health* **2017**, *64*, 41–52. [CrossRef]
56. Marus, J.R.; Magee, M.J.; Manikonda, K.; Nichols, M.C. Outbreaks of *Salmonella enterica* infections linked to animal contact: Demographic and outbreak characteristics and comparison to foodborne outbreaks—United States, 2009–2014. *Zoonoses Public Health* **2019**, *66*, 370–376. [CrossRef] [PubMed]
57. Zhang, S.; Li, S.; Gu, W.; den Bakker, H.; Boxrud, D.; Taylor, A.; Roe, C.; Driebe, E.; Engelthaler, D.M.; Allard, M.; et al. Zoonotic source attribution of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium using genomic surveillance data, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 82–91. [CrossRef] [PubMed]
58. World Health Organization (WHO). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine*, 6th ed.; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 2018.
59. Ruiz, J. Transferable mechanisms of quinolone resistance from 1998 onward. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00007–e00019. [CrossRef] [PubMed]
60. Correia, S.; Poeta, P.; Hébraud, M.; Capelo, J.L.; Igrejas, G. Mechanisms of quinolone action and resistance: Where do we stand? *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 551–559. [CrossRef] [PubMed]
61. Delgado-Suárez, E.J.; Ortiz-López, R.; Gebreyes, W.A.; Allard, M.W.; Barona-Gómez, F.; Rubio-Lozano, M.S. Genomic surveillance links livestock production with the emergence and spread of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. *J. Microbiol.* **2019**, *57*, 271–280. [CrossRef] [PubMed]

62. Delgado-Suárez, E.J.; Palós-Guitérrez, T.; Ruiz-López, F.A.; Hernández Pérez, C.F.; Ballesteros-Nova, N.E.; Soberanis-Ramos, O.; Méndez-Medina, R.D.; Allard, M.W.; Rubio-Lozano, M.S. Genomic surveillance of antimicrobial resistance shows cattle and poultry are a moderate source of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* in Mexico. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0243681. [CrossRef]
63. Zaidi, M.B.; Estrada-García, T.; Campos, F.D.; Chim, R.; Arjona, F.; Leon, M.; Michell, A.; Chaussabel, D. Incidence, clinical presentation, and antimicrobial resistance trends in *Salmonella* and *Shigella* infections from children in Yucatan, Mexico. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 288. [CrossRef]
64. McDermott, P.F.; Zhao, S.; Tate, H. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*, 780–790. [CrossRef]
65. Sjölund-Karlsson, M.; Folster, J.P.; Pecic, G.; Joyce, K.; Medalla, F.; Rickert, R.; Whichard, J.M. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates from humans in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 2142–2144. [CrossRef] [PubMed]
66. Sjölund-Karlsson, M.; Howie, R.; Rickert, R.; Krueger, A.; Tran, T.T.; Zhao, S.; Ball, T.; Haro, J.; Pecic, G.; Joyce, K.; et al. Plasmid-mediated quinolone resistance among non-typhi *Salmonella enterica* isolates, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1789–1791. [CrossRef] [PubMed]
67. Cuypers, W.L.; Jacobs, J.; Wong, V.; Klemm, E.J.; Deborggraeve, S.; Van Puyvelde, S. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: Insights by whole-genome sequencing. *Microbial. Genomics.* **2018**, *4*, e000195. [CrossRef]
68. Kim, J.; Han, X.; Bae, J.; Chui, L.; Louie, M.; Finley, R.; Mulvey, M.R.; Ferrato, C.J.; Jeon, B. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in non-typhoidal *Salmonella* strains with resistance and reduced susceptibility to fluoroquinolones from human clinical cases in Alberta, Canada, 2009–2013. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 2988–2990. [CrossRef] [PubMed]
69. Luo, Y.; Li, J.; Meng, Y.; Ma, Y.; Hu, C.; Jin, S.; Zhang, Q.; Ding, H.; Cui, S. Joint effects of topoisomerase alterations and plasmid-mediated quinolone-resistant determinants in *Salmonella enterica* Typhimurium. *Microb. Drug. Resist.* **2011**, *17*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
70. Bharat, A.; Petkau, A.; Avery, B.P.; Chen, J.C.; Folster, J.P.; Carson, C.A.; Kearney, A.; Nadon, C.; Mabon, P.; Thiessen, J.; et al. Correlation between phenotypic and in silico detection of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* in Canada using Staramr. *Microorganisms* **2022**, *10*, 292. [CrossRef] [PubMed]
71. Hawkey, J.; Le Hello, S.; Doublet, B.; Granier, S.A.; Hendriksen, R.S.; Fricke, W.F.; Ceyssens, P.J.; Gomart, C.; Billman-Jacobe, H.; Holt, K.E.; et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microbial. Genomics.* **2019**, *5*, e000269. [CrossRef] [PubMed]
72. Van Hoek, A.H.; Mevius, D.; Guerra, B.; Mullany, P.; Roberts, A.P.; Aarts, H.J. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 203. [CrossRef]
73. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 32nd ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA; Available online: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed on 1 May 2022).
74. Van Duikeren, E.; Schwarz, C.; Bouchard, D.; Catry, B.; Pomba, C.; Baptiste, K.E.; Moreno, M.A.; Rantala, M.; Ružauskas, M.; Sanders, P.; et al. The use of aminoglycosides in animals within the EU: Development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: A review. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 2480–2496. [CrossRef]
75. Cox, G.W.; Parmley, E.J.; Avery, B.P.; Irwin, R.J.; Reid-Smith, R.J.; Deckert, A.E.; Finley, R.L.; Daignault, D.; Alexander, D.C.; Allen, V.; et al. A One-Health genomic investigation of gentamicin resistance in *Salmonella* from human and chicken sources in Canada, 2014 to 2017. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e00966–21. [CrossRef]
76. Nyirabahizi, E.; Tyson, G.H.; Tate, H.; Strain, E. The Western United States has greater antibiotic resistance among *Salmonella* recovered from intestinal cecal samples of food animals. *J. Food Protect.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
77. Markley, J.L.; Wenciewicz, T.A. Tetracycline-inactivating enzymes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1058. [CrossRef] [PubMed]
78. Nunes, O.C.; Manaia, C.M.; Kolvenbach, B.A.; Corvini PE, X. Living with sulfonamides: A diverse range of mechanisms observed in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 10389–10408. [CrossRef] [PubMed]
79. Monte, D.F.; Sellera, F.P.; Lopes, R.; Keelara, S.; Landgraf, M.; Greene, S.; Fedorka-Cray, P.J.; Thakur, S. Class 1 integron-borne cassettes harboring *bla* CARB-2 gene in multidrug-resistant and virulent *Salmonella* Typhimurium ST19 strains recovered from clinical human stool samples, United States. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0240978. [CrossRef] [PubMed]
80. Nishino, K.; Latifi, T.; Groisman, E.A. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 126–141. [CrossRef] [PubMed]
81. Park, C.J.; Li, J.; Zhang, X.; Gao, F.; Benton, C.S.; Andam, C.P. Diverse lineages of multidrug resistant clinical *Salmonella enterica* and a cryptic outbreak in New Hampshire, USA revealed from a year-long genomic surveillance. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *87*, 104645. [CrossRef]
82. Rahmati, S.; Yang, S.; Davidson, A.L.; Zechiedrich, E.L. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 677–685. [CrossRef]
83. Tezel, U.; Pavlostathis, S.G. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 296–304. [CrossRef]
84. OIE. OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials. 2016. Available online: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdf (accessed on 20 May 2022).

85. Monte, D.F.; Lincopan, N.; Fedorka-Cray, P.J.; Landgraf, M. Current insights on high priority antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in food and foodstuffs: A review. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, *26*, 35–46. [\[CrossRef\]](#)
86. Elbediwi, M.; Tang, Y.; Shi, D.; Ramadan, H.; Xu, Y.; Xu, S.; Li, Y.; Yue, M. Genomic investigation of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* isolates from dead chick embryos in China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 684400. [\[CrossRef\]](#)
87. Diaconu, E.L.; Alba, P.; Feltrin, F.; Di Matteo, P.; Iurescia, M.; Chelli, E.; Donati, V.; Marani, I.; Giacomi, A.; Franco, A.; et al. Emergence of IncHI2 plasmids with mobilized colistin resistance (*mcr*)-9 gene in *esbl*-producing, multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium and its monophasic variant ST34 from food-producing animals in Italy. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 705230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Monte, D.F.; Lincopan, N.; Berman, H.; Cerdeira, L.; Keelara, S.; Siddhartha Thakur, S.; Fedorka-Cray, P.; Landgraf, M. Genomic features of high-priority *Salmonella enterica* serovars circulating in the food production chain, Brazil, 2000–2016. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 11058. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Ball, T.; Monte, D.; Aidara-Kane, A.; Matheu, J.; Ru, H.; Thakur, S.; Ejobi, E.; Fedorka-Cray, P. International lineages of *Salmonella enterica* serovars isolated from chicken farms, Wakiso District, Uganda. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0220484. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Moon, D.C.; Kim, S.-J.; Mechesso, A.F.; Kang, H.Y.; Song, H.-J.; Choi, J.-H.; Yoon, S.-S.; Lim, S.-K. Mobile colistin resistance gene *mcr*-1 detected on an IncI2 plasmid in *Salmonella* Typhimurium Sequence Type 19 from a healthy pig in South Korea. *Microorganisms* **2021**, *9*, 398. [\[CrossRef\]](#)
91. Wu, B.; Ed-Dra, A.; Pan, H.; Dong, C.; Jia, C.; Yue, M. Genomic investigation of *Salmonella* isolates recovered from a pig slaughtering process in Hangzhou, China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 704636. [\[CrossRef\]](#)
92. Viana, C.; Grossi, J.L.; Sereno, M.J.; Yamatogi, R.S.; Bersot, L.D.S.; Call, D.R.; Nero, L.A. Phenotypic and genotypic characterization of non-typhoidal *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109406. [\[CrossRef\]](#)
93. Carroll, L.M.; Wiedmann, M.; den Bakker, H.; Siler, J.; Warchocki, S.; Kent, D.; Lyalina, S.; Davis, M.; Sischo, W.; Besser, T.; et al. Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e00140-17. [\[CrossRef\]](#)
94. Jensen, L.B.; Garcia-Migura, L.; Valenzuela, A.J.; Lohr, M.; Hasman, H.; Aarestrup, F.M. A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *80*, 25–43. [\[CrossRef\]](#)
95. Ashton, P.M.; Nair, S.; Peters, T.M.; Bale, J.A.; Powell, D.G.; Painset, A.; Tewolde, R.; Schaefer, U.; Jenkins, C.; Dallman, T.J.; et al. *Salmonella* Whole Genome Sequencing Implementation Group. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ* **2016**, *4*, e1752. [\[CrossRef\]](#)
96. Chattaway, M.A.; Dallman, T.J.; Larkin, L.; Nair, S.; McCormick, J.; Mikhail, A.; Hartman, H.; Godbole, G.; Powell, D.; Day, M.; et al. The transformation of reference microbiology methods and surveillance for *Salmonella* with the use of whole genome sequencing in England and Wales. *Public. Health Front.* **2019**, *7*, 317. [\[CrossRef\]](#)
97. Van Goethem, N.; Van Den Bossche, A.; Ceyssens, P.J.; Lajot, A.; Coucke, W.; Vernelen, K.; Roosens, N.C.H.; De Keersmaecker, S.C.J.; Van Cauteren, D.; Mattheus, W. Coverage of the national surveillance system for human *Salmonella* infections, Belgium, 2016–2020. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0256820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Brown, E.; Dessai, U.; McGarry, S.; Gerner-Smidt, P. Use of whole-genome sequencing for food safety and public health in the United States. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, *16*, 441–450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Hoang, T.; da Silva, A.G.; Jennison, A.V.; Williamson, D.A.; Howden, B.P.; Seemann, T. AusTrakka: Fast-tracking nationalized genomics surveillance in response to the COVID-19 pandemic. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 865. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
100. Goig, G.A.; Blanco, S.; Garcia-Basteiro, A.L.; Comas, I. Contaminant DNA in bacterial sequencing experiments is a major source of false genetic variability. *BMC Biol.* **2020**, *18*, 1–15. [\[CrossRef\]](#)
101. Zve, Y.H.; Chin, S.F.; Kohli, G.S.; Aung, K.T.; Yang, L.; Yuk, H.G. Whole genome sequencing (WGS) fails to detect antimicrobial resistance (AMR) from heteroresistant subpopulation of *Salmonella enterica*. *Food Microbiol.* **2020**, *91*, 103530. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
102. Zankari, E. Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 4986. [\[CrossRef\]](#)
103. Achtman, M.; Zhou, Z.; Alikhan, N.F.; Tyne, W.; Parkhill, J.; Cormican, M.; Chiou, C.S.; Torpdahl, M.; Litrup, E.; Prendergast, D.M.; et al. Genomic diversity of *Salmonella enterica*—The UoWUCC 10 K genomes project. *Wellcome Open Res.* **2021**, *5*, 223. [\[CrossRef\]](#)
104. Zhou, Z.; Alikhan, N.F.; Mohamed, K.; Fan, Y.; Achtman, M.; Brown, D.; Agama Study Group; Achtman, M. The Enterobase user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res.* **2020**, *30*, 138–152. [\[CrossRef\]](#)
105. Quijada, N.M.; Rodriguez-Lázaro, D.; Eiros, J.M.; Hernández, M. TORMES: An automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 4207–4212. [\[CrossRef\]](#)
106. Wajid, B.; Serpedin, E. Do it yourself guide to genome assembly. *Brief. Funct. Genomics.* **2016**, *15*, 1–9. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Jacobsen, A.; Hendriksen, R.S.; Aarestrup, F.M.; Ussery, D.W.; Friis, C. The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb. Ecol.* **2011**, *62*, 487–504. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
108. Gupta, S.K.; Padmanabhan, B.R.; Diene, S.M.; Lopez-Rojas, R.; Kempf, M.; Landraud, L.; Rolain, J.M. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 212–220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

109. Alcock, B.P.; Raphenya, A.R.; Lau, T.T.; Tsang, K.K.; Bouchard, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D517–D525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. McArthur, A.G.; Waglehner, N.; Nizam, F.; Yan, A.; Azad, M.A.; Baylay, A.J.; Bhullar, K.; Canova, M.J.; De Pascale, G.; Ejim, L.; et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3348–3357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Carattoli, A.; Zankari, E.; García-Fernández, A.; Voldby Larsen, M.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Zankari, E.; Allesøe, R.; Joensen, K.G.; Cavaco, L.M.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2764–2768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Babicki, S.; Arndt, D.; Marcu, A.; Liang, Y.; Grant, J.R.; Maciejewski, A.; Wishart, D.S. Heatmapper: Web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W147–W153. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials

Supplementary Table S1. Data of the analyzed genomes in the present work.

No.	Sample	Country	Year	Source ¹	Accession No./Assembly Barcode
1	AUS01H_2017	Australia	2017	Human	SRR14143603
2	AUS02H_2018	Australia	2018	Human	SRR14145155
3	AUS03H_2006	Australia	2006	Human	SRR5090724
4	AUS04_2021	Australia	2021	ND/Others	SAL_PC2750AA_AS
5	BEL01H_2020	Belgium	2020	Human	ERR4775375
6	CAN01H_2009	Canada	2009	Human	SRR12712089
7	CAN02H_2018	Canada	2018	Human	SRR13426370
8	CAN03H_2011	Canada	2011	Human	SRR13605059
9	CAN04H_2008	Canada	2008	Human	SRR13769784
10	CAN05H_2017	Canada	2017	Human	SRR13827060
11	CAN06H_2017	Canada	2017	Human	SRR13849853
12	CAN07H_2017	Canada	2017	Human	SRR13952785
13	CAN08H_2017	Canada	2017	Human	SRR13952800
14	CAN09H_2018	Canada	2018	Human	SRR14102894
15	CAN10H_2018	Canada	2018	Human	SRR14102906
16	CAN11H_2018	Canada	2018	Human	SRR14767203
17	CAN19H_2016	Canada	2016	Human	SRR15242716
18	CAN12H_2017	Canada	2017	Human	SRR15242717
19	CAN13H_2015	Canada	2015	Human	SRR15242758
20	CAN14H_2016	Canada	2016	Human	SRR15242930
21	CAN15H_2014	Canada	2014	Human	SRR15242943
22	CAN16H_2014	Canada	2014	Human	SRR15242946
23	CAN17H_2008	Canada	2008	Human	SAL_KC5843AA_AS
24	CAN18H_2010	Canada	2010	Human	SAL_KC5864AA_AS
25	CAN21H_2018	Canada	2018	Human	SAL_OC2346AA_AS
26	CAN20H_2017	Canada	2017	Human	SAL_RC8451AA_AS
27	DEN01H_2002	Denmark	2002	Human	ERR2719681
28	DEN02H_2011	Denmark	2011	Human	ERR2729121
29	DEN04H_2017	Denmark	2017	Human	ERR2849935
30	DEN03H_2009	Denmark	2009	Human	ERR2729149
31	DEN05H_2009	Denmark	2009	Human	ERR3060821
32	DEN06H_2008	Denmark	2008	Human	ERR3901222
33	FRA01H_2019	France	2019	Human	SAL_MC3552AA_AS
34	FRA02H_2019	France	2019	Human	SAL_MC3509AA_AS
35	IND01F_2011	India	2011	Food	SRR1107438
36	IND02F_2010	India	2010	Food	SRR1300736
37	IND03F_2015	India	2015	Food	SRR2029592
38	IRE01H_2007	Ireland	2007	Human	ERR2693630
39	IRE02H_2016	Ireland	2016	Human	SAL_OA1032AA_AS
40	MEX26H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2693961
41	MEX38H_2004	Mexico	2004	Human	ERR2719629

42	MEX40H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2719652
43	MEX01B_2004	Mexico	2004	Bovine	ERR2719833
44	MEX56R_2019	Mexico	2019	Water/River	SRR11016193
45	MEX57R_2019	Mexico	2019	Water/River	SRR11028646
46	MEX58R_2019	Mexico	2019	Water/River	SRR11028649
47	MEX05D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029506
48	MEX06D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029518
49	MEX07D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029520
50	MEX59R_2019	Mexico	2019	Water/River	SRR11029522
51	MEX08D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029523
52	MEX60R_2019	Mexico	2019	Water/River	SRR11029526
53	MEX09D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029528
54	MEX10D_2019	Mexico	2019	Water/Dam	SRR11029530
55	MEX11F_2005	Mexico	2005	Food	SRR6010020
56	MEX12F_2004	Mexico	2004	Food	SRR9017255
57	MEX53_2004	Mexico	2004	ND/Others	SRR9099710
58	MEX13F_2004	Mexico	2004	Food	SRR9102687
59	MEX54_2004	Mexico	2004	ND/Others	SRR9102691
60	MEX55_2004	Mexico	2004	ND/Others	SRR9102693
61	MEX24H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2693572
62	MEX25H_2005	Mexico	2005	Human	ERR2693575
63	MEX27H_2005	Mexico	2005	Human	ERR2693974
64	MEX61S_2003	Mexico	2003	Swine	ERR2693980
65	MEX28H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2693981
66	MEX29H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2710803
67	MEX30H_2004	Mexico	2004	Human	ERR2710805
68	MEX31H_2002	Mexico	2002	Human	ERR2710819
69	MEX32H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2710835
70	MEX33H_2004	Mexico	2004	Human	ERR2710854
71	MEX34H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2710856
72	MEX35H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2710865
73	MEX36H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2710869
74	MEX37H_2004	Mexico	2004	Human	ERR2710884
75	MEX39H_2003	Mexico	2003	Human	ERR2719641
76	MEX41H_2004	Mexico	2004	Human	ERR2719677
77	MEX42H_2004	Mexico	2004	Human	ERR3482042
78	MEX62S_2003	Mexico	2003	Swine	ERR3482056
79	MEX43H_2002	Mexico	2002	Human	ERR3482104
80	MEX44H_2007	Mexico	2007	Human	ERR3901480
81	MEX45H_2005	Mexico	2005	Human	ERR3901484
82	MEX46H_2004	Mexico	2004	Human	ERR3901491
83	MEX63S_2004	Mexico	2004	Swine	ERR3901497
84	MEX47H_2005	Mexico	2005	Human	ERR3901500
85	MEX64S_2003	Mexico	2003	Swine	ERR3901506

86	MEX04C_2003	Mexico	2003	Chicken	ERR4399209
87	MEX48H_2003	Mexico	2003	Human	ERR4400263
88	MEX49H_2004	Mexico	2004	Human	ERR4400784
89	MEX66B_2004	Mexico	2004	Bovine	SAL-UA1479AA_AS
90	MEX67H_2002	Mexico	2002	Human	SAL-UA1639AA_AS
91	MEX65B_2003	Mexico	2003	Bovine	SAL-UA1633AA_AS
92	MEX50H_2005	Mexico	2005	Human	GCF_001006525
93	MEX51H_2011	Mexico	2011	Human	GCF_001293505
94	MEX02B_2004	Mexico	2004	Bovine	GCF_009497835
95	MEX03B_2004	Mexico	2004	Bovine	GCF_009497855
96	MEX52H_2007	Mexico	2007	Human	GCF_011304815
97	NET01H_2009	Netherlands	2009	Human	ERR4400176
98	POR01F_1965	Portugal	1965	Food	SAL-IA6848AA_AS
99	POR02F_1967	Portugal	1967	Food	SAL-IA6884AA_AS
100	THA02H_2003	Thailand	2003	Human	SRR1106424
101	THA03H_2002	Thailand	2002	Human	SRR1840679
102	THA01C_2019	Thailand	2019	Chicken	SRR14011968
103	UK02H_2004	United Kingdom	2004	Human	ERR2719837
104	UK16H_2012	United Kingdom	2012	Human	SRR1645887
105	UK17H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1957801
106	UK18H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1957825
107	UK20H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1965680
108	UK21_2014	United Kingdom	2014	ND/Others	SRR1967397
109	UK22H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1967622
110	UK23H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1968141
111	UK25H_2015	United Kingdom	2015	Human	SRR1969768
112	UK27_2015	United Kingdom	2015	ND/Others	SRR3286840
113	UK28H_2015	United Kingdom	2015	Human	SRR3322115
114	UK29H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR5584700
115	UK30H_2015	United Kingdom	2015	Human	SRR6062349
116	UK31H_2015	United Kingdom	2015	Human	SRR6074595
117	UK32H_2015	United Kingdom	2015	Human	SRR6111080
118	UK33H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7090670
119	UK34H_2016	United Kingdom	2016	Human	SRR7159857
120	UK35H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7215972
121	UK36H_2016	United Kingdom	2016	Human	SRR7286838
122	UK38H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7402355
123	UK39H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR7408361
124	UK40H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR7444204
125	UK41H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7451170
126	UK42H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR7516730
127	UK43H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7828239
128	UK44H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7828437
129	UK45H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7850686

130	UK46H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7867043
131	UK47H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7879573
132	UK48H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7910405
133	UK49H_2018	United Kingdom	2018	Human	SRR7962214
134	UK50H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR8548892
135	UK51H_2017	United Kingdom	2017	Human	SRR8553861
136	UK52F_2016	United Kingdom	2016	Food	SRR8658156
137	UK53H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR9054604
138	UK54H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR9261071
139	UK55H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR9719498
140	UK04H_2000	United Kingdom	2000	Human	ERR2693688
141	UK01H_2001	United Kingdom	2001	Human	ERR2693713
142	UK03H_2003	United Kingdom	2003	Human	ERR4399105
143	UK05H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR10519589
144	UK06H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR10519615
145	UK07H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR10561173
146	UK08H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR10600365
147	UK09H_2019	United Kingdom	2019	Human	SRR10810736
148	UK10H_2020	United Kingdom	2020	Human	SRR10900167
149	UK11H_2020	United Kingdom	2020	Human	SRR11041608
150	UK12H_2021	United Kingdom	2021	Human	SRR13485880
151	UK13_2018	United Kingdom	2018	ND/Others	SRR15366175
152	UK14H_2016	United Kingdom	2016	Human	SRR15370189
153	UK15H_2021	United Kingdom	2021	Human	SRR16134724
154	UK19H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1958128
155	UK24H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1968540
156	UK26H_2014	United Kingdom	2014	Human	SRR1970253
157	UK37H_2016	United Kingdom	2016	Human	SRR7359015
158	UK64Wa_2009	United Kingdom	2009	Wild Animal	SRR17893191
159	UK63H_2019	United Kingdom	2019	Human	SAL_SB9289AA_AS
160	UK60H_2016	United Kingdom	2016	Human	SAL_AB5684AA_AS
161	UK61H_2017	United Kingdom	2017	Human	SAL_BB4395AA_AS
162	UK62H_2017	United Kingdom	2017	Human	SAL_JB1106AA_AS
163	UK56F_2016	United Kingdom	2016	Food	SAL_CB6634AA_AS
164	UK57_2018	United Kingdom	2018	ND/Others	SAL_ZA4977AA_AS
165	UK58_2018	United Kingdom	2018	ND/Others	SAL_BB3548AA_AS
166	UK59F_2016	United Kingdom	2016	Food	SAL_CB6630AA_AS
167	US01S_1999	United States	1999	Swine	SRR10063260
168	US05S_2006	United States	2006	Swine	SRR1212306
169	US06S_2003	United States	2003	Swine	SRR1272873
170	US07B_2020	United States	2020	Bovine	SRR12899007
171	US08S_2000	United States	2000	Swine	SRR13024097
172	US09_2020	United States	2020	ND/Others	SRR13221214
173	US13H_2007	United States	2007	Human	SRR1840738

174	US14S_2006	United States	2006	Swine	SRR2532791
175	US15S_2015	United States	2015	Swine	SRR2648752
176	US16H_2012	United States	2012	Human	SRR3097408
177	US17H_2011	United States	2011	Human	SRR3097427
178	US18H_2010	United States	2010	Human	SRR3097562
179	US19H_2011	United States	2011	Human	SRR3097569
180	US20H_2015	United States	2015	Human	SRR3232066
181	US21H_2015	United States	2015	Human	SRR3232068
182	US22H_2015	United States	2015	Human	SRR3233166
183	US23H_2014	United States	2014	Human	SRR4420901
184	US24H_2016	United States	2016	Human	SRR5081545
185	US25H_2017	United States	2017	Human	SRR5336307
186	US26H_2016	United States	2016	Human	SRR5361040
187	US27H_2017	United States	2017	Human	SRR5418841
188	US28H_2012	United States	2012	Human	SRR5573114
189	US29S_2017	United States	2017	Swine	SRR5576032
190	US30H_2017	United States	2017	Human	SRR5605850
191	US31H_2017	United States	2017	Human	SRR5628564
192	US32H_2017	United States	2017	Human	SRR5876908
193	US34H_2017	United States	2017	Human	SRR6334793
194	US35H_2014	United States	2014	Human	SRR6491048
195	US36H_2014	United States	2014	Human	SRR6685032
196	US37H_2015	United States	2015	Human	SRR6685073
197	US38H_2017	United States	2017	Human	SRR6750589
198	US39H_2018	United States	2018	Human	SRR6879627
199	US40_2018	United States	2018	Human	SRR6885440
200	US41P_1957	United States	1957	Poultry	SRR7084742
201	US42H_2012	United States	2012	Human	SRR8435362
202	US43H_2011	United States	2011	Human	SRR8435708
203	US44H_2010	United States	2010	Human	SRR8435716
204	US45H_2010	United States	2010	Human	SRR8435722
205	US46H_2010	United States	2010	Human	SRR8597284
206	US47H_2017	United States	2017	Human	SRR8832720
207	US48S_2006	United States	2006	Swine	SRR949413
208	US02S_1999	United States	1999	Swine	SRR10063300
209	US03H_2007	United States	2007	Human	SRR1133231
210	US04S_2002	United States	2002	Swine	SRR11457455
211	US10_2021	United States	2021	ND/Others	SRR15257871
212	US11S_2003	United States	2003	Swine	SRR1539626
213	US12B_2021	United States	2021	Bovine	SRR16976151
214	US33C_1988	United States	1988	Canine	SRR6311308
215	US49B_2019	United States	2019	Bovine	SAL_BC0558AA_AS
216	US51S_2002	United States	2002	Swine	SAL_EC9748AA_AS
217	US52S_2002	United States	2002	Swine	SAL_EC9744AA_AS

218	US53S_2002	United States	2002	Swine	SAL_FC0153AA_AS
219	US54S_2003	United States	2003	Swine	SAL_FC0279AA_AS
220	US50B_2020	United States	2020	Bovine	SAL_KC7851AA_AS

Note: ¹ND, non-determined

Supplementary Table S2. Data of the ST213 genotype draft genomes obtained from Enterobase¹.

No.	Sample	Accession No. /Assembly Barcode	Genome Length ²	No. Contigs	NSI	Largest Contig	AvgContigLen ³
1	AUS04_2021	SAL_PC2750AA_AS	4841509	187	59979	244544	25890
2	CAN17H_2008	SAL_KC5843AA_AS	5009731	64	334376	881602	78277
3	CAN18H_2010	SAI_KC5864AA_AS	4963062	61	376801	802111	81361
4	CAN21H_2018	SAL_OC2346AA_AS	4887527	80	276895	684657	61094
5	CAN20H_2017	SAL_RC8451AA_AS	4967271	72	394003	881829	68989
6	FRA01H_2019	SAI_MC3552AA_AS	4920430	69	177888	570640	71310
7	FRA02H_2019	SAL_MC3509AA_AS	4902545	138	66077	313196	35525
8	IRE02H_2016	SAL_OA1032AA_AS	4827944	67	223598	698801	72058
9	MEX66B_2004	SAL_UA1479AA_AS	5002191	53	301495	698272	94380
10	MEX67H_2002	SAL_UA1639AA_AS	5083011	65	394092	881604	78200
11	MEX65B_2003	SAL_UA1633AA_AS	5109605	63	393714	881420	81104
12	MEX50H_2005	GCF_001006525	5190370	8	4886081	4886081	648796
13	MFX51H_2011	GCF_001293505	5088186	4	4809574	4809574	1272046
14	MEX02B_2004	GCF_009497835	5096576	4	4837346	4837346	1274144
15	MEX03B_2004	GCF_009497855	5060451	6	4764173	4764173	843408
16	MFX52H_2007	GCF_011304815	5113293	5	4863742	4863742	1022658
17	POR01F_1965	SAL_IA6848AA_AS	4880496	57	376801	683163	85622
18	POR02F_1967	SAL_IA6884AA_AS	4842310	73	195060	498144	66333
19	UK63H_2019	SAL_SB9289AA_AS	4825282	64	198811	635641	75395
20	UK60H_2016	SAL_AB5684AA_AS	4872229	149	107756	324799	32699
21	UK61H_2017	SAL_BB4395AA_AS	4762122	144	108315	327435	33070
22	UK62H_2017	SAI_IB1106AA_AS	4779598	107	87158	392483	44669
23	UK56F_2016	SAL_CB6634AA_AS	5064442	92	225728	451048	55048
24	UK57_2018	SAL_ZA4977AA_AS	4935995	72	223707	699340	68555
25	UK58_2018	SAI_BB3548AA_AS	4876068	68	351396	746587	71706
26	UK59F_2016	SAL_CB6630AA_AS	4867593	74	246550	630437	65778
27	US49B_2019	SAL_BC0558AA_AS	4891355	113	91629	380793	43286
28	US51S_2002	SAL_EC9748AA_AS	4926650	102	282557	843495	48300
29	US52S_2002	SAL_EC9744AA_AS	4935341	154	162197	357102	32047
30	US53S_2002	SAL_FC0153AA_AS	4896274	95	260444	424211	51539
31	US54S_2003	SAL_FC0279AA_AS	4796988	68	376786	843658	70543
32	US50B_2020	SAL_KC7851AA_AS	4775207	63	376487	777577	75796

Notes: ¹ Most of the genomes were obtained with Illumina platform, except GCF_001006525, with PacBio; 454; Illumina GAIIx; GCF_001293505, with PacBio RS; GCF_009497835, with PacBio RSII; GCF_009497855 and GCF_011304815, with Oxford Nanopore MinION. ² Obtained by FORMES; ³ AvgContigLen = Average Contig Length.

Supplementary Table S3. Data of the ST213 genotype draft genomes assembled in this work.

No.	Sample	Accession No.	Genome Length	No. Contigs	NSO	Largest Contig	AvgContigLen ¹
1	AUS01H_2017	SRR14143603	5005729	103	713682	224020	48599
2	AUS02H_2018	SRR14145155	4783219	66	506183	195937	72473
3	AUS03H_2006	SRR5090724	4868786	145	376140	117021	33577
4	BEL01H_2020	ERR4775375	4914470	45	287411	699084	109210
5	CAN01H_2009	SRR12712089	4959284	125	417030	118966	39674
6	CAN02H_2018	SRR13426370	4888923	107	611176	223641	45690
7	CAN03H_2011	SRR13605059	4939010	91	444440	179928	54274
8	CAN04H_2008	SRR13769784	5139077	163	431220	100074	31528
9	CAN05H_2017	SRR13827060	4737356	86	464039	190984	55085
10	CAN06H_2017	SRR13849853	4744496	104	376801	190984	45620
11	CAN07H_2017	SRR13952785	4870761	94	405182	258927	51811
12	CAN08H_2017	SRR13952800	4741452	100	579139	282799	47414
13	CAN09H_2018	SRR14102894	4889645	94	690747	282799	52017
14	CAN10H_2018	SRR14102906	4977996	94	690745	376801	52957
15	CAN11H_2018	SRR14767203	4986889	87	881786	376801	57320
16	CAN12H_2017	SRR15242717	5044018	88	880527	282999	57318
17	CAN13H_2015	SRR15242758	4925887	71	880465	301268	69378
18	CAN14H_2016	SRR15242930	4888133	79	881419	393714	61875
19	CAN15H_2014	SRR15242943	5090233	79	881601	377931	64433
20	CAN16H_2014	SRR15242946	4937121	79	881417	393714	62495
21	CAN19H_2016	SRR15242716	4926622	232	192201	56233	21235
22	DEN01H_2002	ERR2719681	4984481	182	750054	255860	27387
23	DEN02H_2011	ERR2729121	4857281	162	520999	213830	29983
24	DEN03H_2009	ERR2729149	5148477	53	223258	690860	97141
25	DEN04H_2017	ERR2849935	4871803	116	506473	161553	41998
26	DEN05H_2009	ERR3060821	5144940	51	274130	809358	100881
27	DEN06H_2008	ERR3901222	5009163	49	243737	717899	102227
28	IND01F_2011	SRR1107438	4899621	114	699340	255941	42979
29	IND02F_2010	SRR1300736	4844134	97	699340	198572	49942
30	IND03F_2015	SRR2029592	4882663	189	699340	213930	25834
31	IRE01H_2007	ERR2693630	4821095	34	323073	549620	141796
32	MEX01B_2004	ERR2719833	5073584	213	628512	282373	23819
33	MEX04C_2003	ERR4399209	5047407	67	301232	628447	75334
34	MEX05D_2019	SRR11029506	4847992	83	819000	246039	58409
35	MEX06D_2019	SRR11029518	4851815	83	628510	218638	58455
36	MEX07D_2019	SRR11029520	4849629	82	818999	282777	59141
37	MEX08D_2019	SRR11029523	4851671	82	628678	223363	59166
38	MEX09D_2019	SRR11029528	4852917	88	880793	223363	55146
39	MEX10D_2019	SRR11029530	4851087	75	804935	223363	64681
40	MEX11F_2005	SRR6010020	4984709	97	690745	297919	51388
41	MEX12F_2004	SRR9017255	5149322	156	698621	183055	33008
42	MEX13F_2004	SRR9102687	5077540	123	684646	196723	41280

43	MEX24H_2003	ERR2693572	5090293	57	246638	498032	89303
44	MEX25H_2005	ERR2693575	5053940	81	238479	498021	62394
45	MEX26H_2003	ERR2693961	5226363	172	862980	376701	30385
46	MEX27H_2005	ERR2693974	5184205	63	301234	578153	82288
47	MEX28H_2003	ERR2693981	5055607	51	340697	818845	99129
48	MEX29H_2003	ERR2710803	5103298	53	376541	818964	96288
49	MEX30H_2004	ERR2710805	5011626	45	335267	818986	111369
50	MEX31H_2002	ERR2710819	5042977	58	282644	880998	86947
51	MEX32H_2003	ERR2710835	5214099	59	335267	595479	88374
52	MEX33H_2004	ERR2710854	5062610	57	282961	628497	88817
53	MEX34H_2003	ERR2710856	5121709	53	376541	819028	96636
54	MEX35H_2003	ERR2710865	5060644	53	376541	880997	95483
55	MEX36H_2003	ERR2710869	5042111	70	137483	366728	72030
56	MEX37H_2004	ERR2710884	4890507	41	228871	577382	119280
57	MEX38H_2004	ERR2719629	5096019	236	819186	240337	21593
58	MEX39H_2003	ERR2719641	5178225	59	246700	595279	87766
59	MEX40H_2003	ERR2719652	5115286	230	819354	283231	22240
60	MEX41H_2004	ERR2719677	5024458	64	201110	796774	78507
61	MEX42H_2004	ERR3482042	5031586	42	276732	819018	119799
62	MEX43H_2002	ERR3482104	5033740	68	196368	628357	74025
63	MEX44H_2007	ERR3901480	5033592	42	282876	819396	119847
64	MEX45H_2005	ERR3901484	5036881	50	276486	866946	100737
65	MEX46H_2004	ERR3901491	5036640	54	265342	819203	93271
66	MEX47H_2005	ERR3901500	5124857	65	223076	577790	78843
67	MEX48H_2003	ERR4400263	5060979	60	246672	690117	84349
68	MEX49H_2004	ERR4400784	5090047	60	280191	628306	84834
69	MEX53_2004	SRR9099710	4994658	98	881418	298344	50965
70	MEX54_2004	SRR9102691	5020626	150	684612	279416	33470
71	MEX55_2004	SRR9102693	5224092	121	881602	377276	43174
72	MEX56R_2019	SRR11016193	4996578	78	733742	301490	64058
73	MEX57R_2019	SRR11028646	4862823	81	628512	196238	60034
74	MEX58R_2019	SRR11028649	4861711	77	716177	201315	63139
75	MEX59R_2019	SRR11029522	4852841	77	628510	223363	63023
76	MEX60R_2019	SRR11029526	4853195	79	690305	223363	61432
77	MEX61S_2003	ERR2693980	5166477	46	301234	595396	112314
78	MEX62S_2003	ERR3482056	5001881	55	301234	696959	90943
79	MEX63S_2004	ERR3901497	5012726	44	301227	819125	113925
80	MEX64S_2003	ERR3901506	5079411	50	276578	690121	101588
81	NET01H_2009	ERR4400176	4961200	41	273107	745306	121004
82	THA01C_2019	SRR14011968	4981734	37	333625	745908	134641
83	THA02H_2003	SRR1106424	4875802	108	545399	141530	45146
84	THA03H_2002	SRR1840679	4863904	113	361630	175502	43043
85	UK01H_2001	ERR2693713	4816370	45	213554	698735	107030
86	UK02H_2004	ERR2719837	5136441	234	740641	282373	21950

87	UK03H_2003	ERR4399105	4993894	43	301104	610177	116137
88	UK04H_2000	ERR2693688	4860468	34	377353	681673	142954
89	UK05H_2019	SRR10519589	4809723	55	178073	506316	87449
90	UK06H_2019	SRR10519615	4808838	57	152759	506467	84365
91	UK07H_2019	SRR10561173	4868036	54	201920	627869	90148
92	UK08H_2019	SRR10600365	4848636	58	145075	377070	83597
93	UK09H_2019	SRR10810736	4810321	56	164066	506081	85898
94	UK10H_2020	SRR10900167	4812824	56	178078	377063	85943
95	UK11H_2020	SRR11041608	4807025	66	145071	330486	72833
96	UK12H_2021	SRR13485880	4709598	46	222922	547828	102382
97	UK13_2018	SRR15366175	4846205	61	178073	376487	79445
98	UK14H_2016	SRR15370189	4919495	54	213661	480882	91101
99	UK15H_2021	SRR16134724	4867726	60	168525	524400	81128
100	UK16H_2012	SRR1645887	5008330	123	536760	188144	40718
101	UK17H_2014	SRR1957801	4915187	222	367624	111333	22140
102	UK18H_2014	SRR1957825	4727624	138	495228	120281	34258
103	UK19H_2014	SRR1958128	4769042	148	51118	195382	32223
104	UK20H_2014	SRR1965680	4775349	87	520939	149344	54889
105	UK21_2014	SRR1967397	4769372	181	221189	58289	26350
106	UK22H_2014	SRR1967622	4972525	91	438474	171329	54643
107	UK23H_2014	SRR1968141	4716217	100	247110	130554	47162
108	UK24H_2014	SRR1968540	4914777	93	94543	194596	52847
109	UK25H_2015	SRR1969768	4765403	99	438583	213775	48135
110	UK26H_2014	SRR1970253	4911862	113	104190	267122	43467
111	UK27_2015	SRR3286840	4775822	72	506599	192094	66330
112	UK28H_2015	SRR3322115	4860815	98	506045	134356	49600
113	UK29H_2017	SRR5584700	4774223	113	255530	91445	42249
114	UK30H_2015	SRR6062349	4817828	87	506704	187070	55377
115	UK31H_2015	SRR6074595	4823317	88	506430	178183	54810
116	UK32H_2015	SRR6111080	4819431	87	506337	170134	55395
117	UK33H_2018	SRR7090670	4852645	78	398413	195744	62213
118	UK34H_2016	SRR7159857	4931502	91	442640	278051	54192
119	UK35H_2018	SRR7215972	4826826	93	506048	145156	51901
120	UK36H_2016	SRR7286838	4921493	81	627762	196194	60759
121	UK37H_2016	SRR7359015	4913045	119	84743	231872	41286
122	UK38H_2018	SRR7402355	4717468	58	818704	171817	81335
123	UK39H_2017	SRR7408361	4820570	86	320870	186932	56053
124	UK40H_2017	SRR7444204	4781053	64	506241	178182	74703
125	UK41H_2018	SRR7451170	4864252	95	506058	182615	51202
126	UK42H_2017	SRR7516730	4785033	84	506520	187009	56964
127	UK43H_2018	SRR7828239	4865649	63	404856	195736	77232
128	UK44H_2018	SRR7828437	4857716	109	320863	110301	44566
129	UK45H_2018	SRR7850686	4820031	85	506337	187070	56706
130	UK46H_2018	SRR7867043	4857683	86	470066	149343	56484

131	UK47H_2018	SRR7879573	4856791	82	324616	178183	59229
132	UK48H_2018	SRR7910405	4861250	78	506337	178183	62323
133	UK49H_2018	SRR7962214	4778772	69	320863	185520	69257
134	UK50H_2017	SRR8548892	4717030	57	497880	222576	82754
135	UK51H_2017	SRR8553861	4818260	94	320863	143281	51258
136	UK52F_2016	SRR8658156	4862720	84	628038	196210	57889
137	UK53H_2019	SRR9054604	4970061	79	506338	149529	62912
138	UK54H_2019	SRR9261071	4910924	78	324477	186932	62960
139	UK55H_2019	SRR9719498	4982417	78	628037	190277	63877
140	UK64Wa_2009	SRR17893191	4894539	60	178070	506499	81575
141	US01S_1999	SRR10063260	5024874	134	777921	184452	37499
142	US02S_1999	SRR10063300	4860499	191	42375	186524	25447
143	US03H_2007	SRR1133231	5397470	93	149553	428033	58037
144	US04S_2002	SRR11457455	4890263	78	158492	414669	62695
145	US05S_2006	SRR1212306	4837178	83	843679	377608	58279
146	US06S_2003	SRR1272873	4973359	120	539654	224390	41444
147	US07B_2020	SRR12899007	4954094	131	267822	126841	37817
148	US08S_2000	SRR13024097	4995418	85	683993	393714	58769
149	US09_2020	SRR13221214	5013520	69	690746	376800	72659
150	US10_2021	SRR15257871	4998408	55	222653	880812	90880
151	US11S_2003	SRR1539626	5012142	51	257511	683073	98277
152	US12B_2021	SRR16976151	4912376	150	62781	212495	32749
153	US13H_2007	SRR1840738	5116122	117	867275	238695	43727
154	US14S_2006	SRR2532791	4905444	85	843495	376786	57711
155	US15S_2015	SRR2648752	5035448	139	628524	196325	36226
156	US16H_2012	SRR3097408	4883365	189	320444	130556	25837
157	US17H_2011	SRR3097427	4941374	156	189650	79226	31675
158	US18H_2010	SRR3097562	5079692	118	604635	171818	43048
159	US19H_2011	SRR3097569	5019108	124	442288	195736	40476
160	US20H_2015	SRR3232066	5001087	109	684716	224308	45881
161	US21H_2015	SRR3232068	5001291	110	512661	224904	45466
162	US22H_2015	SRR3233166	5004137	117	587415	301893	42770
163	US23H_2014	SRR4420901	4895682	140	881603	398300	34969
164	US24H_2016	SRR5081545	4953506	111	690746	394010	44626
165	US25H_2017	SRR5336307	4939187	93	827916	384085	53109
166	US26H_2016	SRR5361040	5040741	82	628500	282141	61472
167	US27H_2017	SRR5418841	5320793	136	1321794	653515	39123
168	US28H_2012	SRR5573114	5029191	86	881418	394010	58478
169	US29S_2017	SRR5576032	5095906	89	982743	223102	57257
170	US30H_2017	SRR5605850	5095277	165	513631	255131	30880
171	US31H_2017	SRR5628564	5073878	100	687841	344084	50738
172	US32H_2017	SRR5876908	4895999	115	690745	321169	42573
173	US33C_1988	SRR6311308	4899797	72	139294	363992	68052
174	US34H_2017	SRR6334793	4961916	89	690745	276882	55751

175	US35H_2014	SRR6491048	4983159	188	268654	69487	26506
176	US36H_2014	SRR6685032	4840297	76	699340	224196	63688
177	US37H_2015	SRR6685073	5155149	137	881602	282799	37628
178	US38H_2017	SRR6750589	4967988	91	587538	301490	54593
179	US39H_2018	SRR6879627	4881798	178	639984	91060	27425
180	US40_2018	SRR6885440	5018417	78	714139	256424	64338
181	US41P_1957	SRR7084742	4800131	87	735022	376801	55173
182	US42H_2012	SRR8435362	4876948	73	690746	282799	66807
183	US43H_2011	SRR8435708	5028636	136	454104	109679	36975
184	US44H_2010	SRR8435716	5104904	126	515104	282800	40515
185	US45H_2010	SRR8435722	5098439	98	603403	253501	52024
186	US46H_2010	SRR8597284	4849920	80	690747	301486	60624
187	US47H_2017	SRR8832720	5108363	134	583607	192331	38122
188	US48S_2006	SRR949413	4908411	92	690758	376786	53352

Note: ¹AvgContigLen: = Average Contig Length

CAPÍTULO III

Análisis epidemiológico molecular de cepas globales del genotipo emergente ST213 de *Salmonella* Typhimurium

Resumen

Después de su reporte como genotipo emergente en salud pública en México, el genotipo ST213 se ha reportado en Estados Unidos y Canadá, distintos países europeos, de Asia y en Australia. Los reportes iniciales en México documentaron que dicho genotipo porta genes de resistencia múltiple a antibióticos y de virulencia, por lo que su dispersión lo hace de relevancia en salud pública a nivel global. La disponibilidad de cepas globales del genotipo ST213 permite la realización de un estudio epidemiológico mediante el análisis genómico comparativo. En el presente trabajo se evaluaron 256 genomas de cepas globales del genotipo ST213, procedentes de distintos tipos de muestra y de distintos años de aislamiento. Se encontraron 124 genes de virulencia en los genomas analizados, con los que se pudieron generar 33 perfiles de virulencia distintos. El patrón de agrupamiento con base en genes de virulencia genera dos subgrupos, uno conformado por 79 genomas obtenidos principalmente en Europa y Asia, y otro por 176 genomas de cepas principalmente de Norteamérica. Los genomas de las cepas del genotipo ST213 analizadas presentan señal temporal y la filogenia datada obtenida sugiere que el ancestro común de dicho genotipo emergió en 1818 (95% HPD: 1665-1910). Además, se separan de manera robusta dos clados que contienen más del 90% de cepas de Eurasia (Clado I: Europa, India Australia) y Norteamérica (Clado II: EU, Canadá y México), los cuales divergen alrededor de 1873 (95% HPD: 1815-1927). La red de dispersión generada con relación al tipo de muestra documenta que el principal elemento de dispersión del genotipo ST213 es el ser humano, en estrecha relación con los alimentos. Con relación en el país de origen, la red de dispersión indica claramente que México fue el foco de dispersión hacia E. U y Canadá; y que de E.U y/o Canadá, el genotipo ST213 se dispersó hacia el Reino Unido, de donde se ha dispersado al resto de Europa, Asia y Oceanía. El presente trabajo permite generar hipótesis robustas sobre la historia evolutiva del genotipo ST213 a nivel global y diferenciar los determinantes de resistencia a antibióticos y de virulencia, así como de dispersión entre el genotipo y ST213 en el mundo.

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos representan un grave problema de salud pública a nivel global (Pires et al., 2021), que puede agravarse en el futuro como consecuencia del cambio climático (Misiou y Koutsoumanis, 2022). Entre los principales patógenos asociados a las enfermedades transmitidas por alimentos en distintas regiones del mundo se encuentra *Salmonella enterica* no tifoidea (De Cesare, 2018; Lee y Yoon, 2021). De los más de 2 700 serotipos registrados para *S. enterica*, el serotipo Typhimurium tiene una gran relevancia epidemiológica por su amplia distribución geográfica, la diversidad de hospederos que puede infectar, su capacidad de sobrevivencia afuera del hospedero y su amplia gama de factores de virulencia (Branchu et al., 2018; Cheng et al., 2019; Dos Santos et al., 2019). En las últimas dos décadas se han incrementado los reportes de variedades patogénicas del serotipo Typhimurium que incluyen tanto a la variante monofásica como a distintos genotipos asociados a secuencias tipo (STs) particulares (Li et al., 2017; Panzenhagen et al., 2018; Biswas et al., 2019; Sun et al., 2020; Pulford et al., 2021). Estas variantes poseen características de relevancia en salud pública que incluyen la multi-resistencia a antibióticos, una mayor virulencia y la resistencia a condiciones ambientales adversas. Todas estas características hacen necesario mantener un sistema de vigilancia que permita detectar la dispersión de dichas variantes en nuevas regiones geográficas, la colonización de un nuevo hospedero o el cambio de hospedero y su relación con brotes específicos.

La identificación de patovariantes emergentes de *S. enterica* y otras bacterias patógenas asociadas ha sido posible gracias a la obtención de genomas completos de cepas aisladas de brotes y muestras específicas, y su depósito en bases de datos públicas (Ruan et al., 2020; Feng et al., 2021; Achtman et al., 2022). El análisis genómico comparativo de los distintos serotipos de *S. enterica* ha permitido reconstruir patrones de dispersión, delimitar brotes, establecer cadenas de transmisión del patógeno en el tiempo y en el espacio, así como identificar reservorios ambientales (Sintchenko y Holmes, 2015; Brown et al., 2021; Payne et al., 2021). Además de su utilidad en estudios de epidemiología molecular, el análisis genómico comparativo posibilita la identificación de procesos microevolutivos de *S. enterica*, definiendo la pérdida y ganancia de genes en variantes del patógeno, así como otras modificaciones genómicas que acompañan, y posiblemente contribuyen, a la

emergencia y dispersión de una nueva variante del patógeno (Desai et al., 2013; Key et al., 2020; Sintchenko y Holmes, 2015; Brown et al., 2021).

La reconstrucción de filogenias datadas, o filogenias calibradas en las ramas terminales (*tip-calibrated phylogenies*), es una herramienta bioinformática relativamente reciente que ha permitido evaluar la dispersión de bacterias patógenas a nivel temporal y espacial (Biek et al., 2015; Rieux y Balloux, 2016). Otro término asociado con dicho tipo de análisis es el de filodinámica (Grenfell et al., 2004; du Plessis and Stadler, 2015; Ingle et al., 2021). La filogenias datadas o estudios filodinámicos de *S. Typhimurium* han generado hipótesis robustas sobre procesos microevolutivos y la emergencia de un patógeno particular, han posibilitado la identificación de grupos clonales dentro de serotipos y genotipos, y han establecido patrones de dispersión de patotipos particulares en diferentes escalas espaciales y temporales (Okoro et al., 2012, 2015; Bawn et al., 2020; Achtman et al., 2021; Kirkwood et al., 2021; Fu et al., 2022a, b).

El genotipo ST213 de *S. Typhimurium* se identificó como un genotipo emergente de relevancia en salud pública en México, aislándose de muestras clínicas humanas y de animales, así como de alimentos de origen animal (Wiesner et al., 2009). Análisis posteriores de cepas de dicho genotipo han mostrado que portan plásmidos con determinantes genéticos que les confieren múltiple resistencia a antibióticos (Wiesner et al., 2011). Recientemente nuestro equipo de trabajo documentó la dispersión a nivel global del genotipo ST213, con base en el reporte de genomas en bases de datos (Hernández-Díaz et al., 2022), por lo que dicha variante ha cobrado relevancia en salud pública a nivel global. No obstante, a la fecha no se ha estudiado la dinámica de dispersión de dicho genotipo, ni se ha documentado si la dispersión global de este ha originado distintos grupos clonales.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis epidemiológico molecular del genotipo ST213 a nivel global, con la finalidad de establecer su patrón de dispersión e identificar si existen grupos clonales asociados a regiones geográficas específicas. Se elaboró una filogenia datada de cepas del genotipo ST213 de todo el mundo, y se generaron modelos de patrones de dispersión. Los resultados obtenidos permiten establecer un patrón temporal de dispersión entre países y hospederos/reservorios a nivel global del genotipo ST213 en los últimos 30 años. Se discuten las implicaciones epidemiológicas y de salud pública de los resultados obtenidos.

Material y Métodos

Genomas obtenidos de bases de datos

Se realizó la búsqueda en la plataforma EnteroBase de genomas de *S. Typhimurium* del genotipo ST213, encontrándose 347 reportes de cepas ST213 obtenidas de Australia (4), Bélgica (1), Canadá (22), Dinamarca (6), Francia (2), India (3), Irlanda (2), México (92) Países Bajos (1), Portugal (2), Tailandia (7), Reino Unido (75), Estados Unidos de América (100) y de origen desconocido (30) entre los años 1957 y 2022 (22 de noviembre de 2022). De estos 347 genomas reportados en EnteroBase, se descartaron 97 debido a que: (i) 13 no reportaban el año de aislamiento, el país de origen ni tipo de muestra, (ii) 17 no reportaban el país de aislamiento, 16 de los cuales tampoco reportaban tipo de muestra, (iii) 48 no reportaron año de aislamiento y de estos, 38 no reportaban tipo de muestra, (iv) 18 no estaban disponibles genomas ensamblados o lecturas sin procesar (*reads*) y (v) aquellos que se encontraban duplicados. Después de esta depuración, se obtuvieron 216 conjuntos de pares de lecturas sin procesar del sitio EMBL-EBI: EMBL's European Bioinformatics Institute y 33 genomas ensamblados (*draft genomes*) se obtuvieron directamente del sitio de EnteroBase. En la Tabla Suplementaria S1 se muestran los metadatos de las cepas ST213 cuyos genomas no fueron incluidas en nuestro análisis previo (Hernández-Díaz et al., 2022). Se añadieron los genomas de 10 cepas de *S. enterica* aisladas entre 2008 y 2011 en el estado de Michoacán de muestras de alimentos de origen animal, principalmente res y cerdo, cuyos datos están en el Capítulo II del presente trabajo.

Análisis bioinformático

Para el análisis de los genomas de las cepas seleccionadas se incluyeron las 216 lecturas sin procesar obtenidas de bases de datos (EMBL-EBI), los 10 conjuntos de lecturas sin procesar de los genomas obtenidos en este trabajo y los 33 genomas ensamblados de EnteroBase. Se utilizó el paquete TORMES 1.3.0 (Quijada et al., 2019) para el análisis del genoma bacteriano completo y/o sus datos de secuenciación sin procesar de Illumina, empleando los filtros de calidad predeterminados. Aquellos *reads* que no pasaron los filtros de calidad de dicho paquete para su ensamblado, se procesaron con BACTOPIA (Petit y Read, 2020) para el control de calidad, ensamblaje y anotación.

Una vez obtenidos los 258 borradores de los genomas (*draft genomes*) del genotipo ST213, se evaluó su calidad considerando el tamaño del genoma (~4.8-5.5 MB), el valor de N50, número de *contigs* (≤ 250 *contigs*), el tamaño promedio de *contig* y el tamaño del *contig* más largo. En la Tabla Suplementaria S2 se muestran los datos de calidad de las cepas cuyos genomas no fueron reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Hernández-Díaz et al., 2022).

Análisis de genes asociados a virulencia

En los genomas seleccionados se identificaron los genes relacionados con virulencia a través de TORMES 1.3.0 con la herramienta VFDB, Virulence Factor Database (Liu et al., 2022). Una vez identificados los genes de virulencia, se construyeron matrices binarias (1,0) para representar la presencia (1) /ausencia (0) de genes de virulencia según el análisis correspondiente. Aquellos genes de virulencia presentes en los genomas de todas las cepas probadas fueron excluidos del análisis. Las matrices fueron analizadas en el servidor ClustVis (Metsalu y Vilo, 2015) con los parámetros de Manhattan y UPGMA, para el cálculo de distancias y la generación del patrón de agrupamiento, respectivamente. Las distancias de Manhattan se calcularon con base en la presencia/ausencia de 124 genes de virulencia. De igual forma, se realizaron matrices y mapas de calor relacionando cada uno de los genes con el tipo de muestra.

Generación del pangenoma de las cepas globales del genotipo ST213

La construcción de pangenoma de las cepas del genotipo ST213 se realizó empleando el software Roary (Page et al., 2015), obteniéndose el genoma núcleo y el genoma accesorio. A su vez, el genoma accesorio se dividió en tres categorías, que fueron *Soft*, *Shell* y *Cloud*. Se generaron de manera independiente los pangenomas de las cepas de México, las de Norteamérica (Canadá y Estados Unidos) y las de Europa, Asia y Oriente, así como el pangenoma global del genotipo ST213.

Reconstrucción filogenética y diagnóstico de señal temporal

Se empleó el paquete IQ-TREE (Minh et al., 2020) para construir una filogenia de máxima verosimilitud (ML) usando el conjunto de SNPs filtrados del genoma núcleo producidos por Gubbins versión 2.2.0 (Croucher et al., 2015) para los 258 genomas del genotipo ST213, a partir de la alineación de SNP del genoma núcleo producido por Snippy (<https://github.com/tseemann/snippy>). El modelo óptimo de evolución determinado utilizando ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) fue TVM+F+ASC. Se generaron 5 000 réplicas de la prueba de relación de verosimilitud aproximada similar a Shimodaira Hasegawa (SH-aLRT) de soporte de rama, y 5 000 réplicas de la prueba de arranque ultrarrápido.

Se utilizó el paquete TempEst versión 1.568 (Rambaut et al., 2016) para evaluar la estructura temporal de la filogenia resultante. Se procedió a construir una filogenia de máxima verosimilitud (ML) usando el conjunto de SNP filtrados producidos por Gubbins 2.2.0 para los genomas de 258 cepas ST213, dos cepas ST313 y el genoma de la cepa referencia ATCC14028 (ST19). Dicha filogenia no mostró evidencia de señal temporal, resultado que se asoció con los genomas AUS03H_2006 y AUS04_2021, por lo que se eliminaron del estudio. En esta nueva reconstrucción filogenética se encontró evidencia de señal temporal (Coeficiente de correlación 0.5133 y $R^2 = 0.2635$) para la construcción de la filogenia datada (Figura 1).

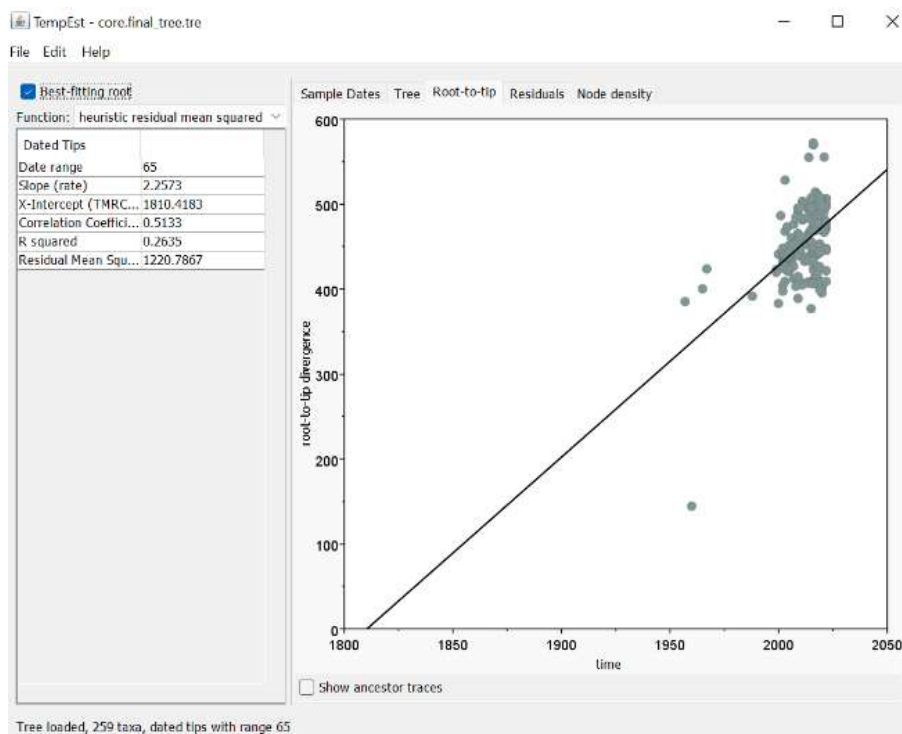


Figura 1. Análisis de la señal temporal de la filogenia ML de las cepas de *S. enterica* estudiadas. La imagen muestra el análisis de regresión. El panel muestra los valores del coeficiente de correlación y de R^2 .

Reconstrucción de la filogenia de datada

El paquete BEAST versión 1.10.4 (Suchard et al., 2018) se usó para construir una filogenia datada usando los SNPs del genoma núcleo detectado en los 256 genomas de las cepas genotipo ST213, las dos cepas ST313 y el genoma de la cepa de referencia ST19 ATCC14028 de *S. Typhimurium*. Se utilizó un reloj molecular logarítmico relajado y un modelo de población *Bayesian Skyline* para tener en cuenta las tasas variables entre linajes y los posibles cambios en el tamaño efectivo de la población, respectivamente. Se utilizó una distribución logarítmica normal. Se realizaron cinco corridas independientes usando esta combinación de modelo de reloj/población, con longitudes de cadena de cien millones de generaciones, muestreando cada 10 000 generaciones.

Se empleó el paquete LogCombiner (Suchard et al., 2018) para agregar los archivos de árbol y registro resultantes producidos, mientras que mediante TreeAnnotator (Suchard et al., 2018) se generó un árbol de máxima credibilidad de clado (MCC) usando alturas de nodo de ancestro común y un 10 % de quemado. La filogenia datada se observó y editó con FigTree versión 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Construcción de redes de transmisión

Se reconstruyó la red de transmisión con el servidor web StrainHub (<https://strainhub.io/>) (de Bernardi-Schneider et al., 2020) con el objeto de describir de manera general las rutas de transmisión de la población de *S. Typhimurium* ST213. Se seleccionó la reconstrucción de ascendencia de Parsimonia y la medida de centralidad de *cercanía*. En StrainHub se ingresó el árbol filogenético ML obtenido de IQ-Tree a partir de Gubbins y metadatos (año y hospedero) en formato de valores separados por comas (CSV) para ejecutar el paso de reconstrucción de ascendencia.

Resultados

Pangenoma del genotipo ST213 de Salmonella Typhimurium

El análisis del pangenoma de los 83 genomas ST213 aislados en México mostró un total de 7 197 genes. Al considerar genomas obtenidos en diferentes países de Europa, Asia y Oceanía (EAO) el pangenoma estuvo formado por 7 536 genes. Cuando se calculó el pangenoma de todos los genomas ST213 obtenidos en Norteamérica, incluyendo los Canadá, Estados Unidos y México, el pangenoma fue 8 630 genes y al considerar juntos los genomas de Norteamérica y EAO el pangenoma aumentó a 10 343 genes. En el caso del pangenoma de México y el pangenoma de EAO se podrían considerar un pangenoma cerrado, ya que el genoma núcleo es mayor que el genoma accesorio. Sin embargo, el pangenoma del genotipo ST213 de Norteamérica y el pangenoma global tiende a ser abierto, porque el genoma accesorio aumentó y fue mayor al genoma núcleo al agregar genomas al estudio, como se puede observar en la Tabla 1. Estas diferencias en el tamaño del pangenoma, particularmente del genoma núcleo, sugiere dinámicas de microevolución distintas en las distintas regiones del mundo.

Tabla 1. Pangenoma de *S. Typhimurium* genotipo ST213.

Genoma	México (n=83)	EAO¹ (n=64)	Norteamérica² (n=164)	Global (n=256)
Pangenoma	7,197	7,536	8,630	10,343
Núcleo (100% genomas)	4,044	3,977	4,036	4,021
Accesorio	3,153	3,559	4,594	6,322
Soft (95-99% genomas)	248	256	162	150
Shell (15-95% genomas)	708	405	837	979
Cloud (<15% genomas)	2,197	2,898	3,595	5,193

Notas: ¹ EAO, Europa, Asia y Oriente; ² México, Canadá, Estados Unidos.

Presencia de genes relacionados con virulencia en los genomas de las cepas ST213 globales

En este trabajo se identificaron 124 genes relacionados con virulencia en las cepas del genotipo ST213, de los cuales 67 se encontraron en el 100% de los genomas analizados, 26 genes se identificaron en el 99.6% de los genomas, ocho genes se encontraron en el 99.2%, cinco genes identificados entre 92 y el 98% y 10 genes se encontraron entre el 26-31% de los genomas. La frecuencia de la presencia de cada uno de los genes de virulencia encontrados se muestra en la Tabla Suplementaria S3. En el caso de genes particulares encontrados en baja proporción, el gen *shdA* se encontró en el 4.7% de los genomas estudiados, el gen *entE* se identificó solo en dos genomas obtenidos en México de origen bovino en 2004, el gen *escS* en un genoma obtenido en Canadá de origen humano en 2018 y los genes *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD* y *iutA* se encontraron solo en un genoma de origen bovino obtenido en Estados Unidos en 2003. De manera interesante, de los 26 genes que se identificaron en el 99% de los genomas, los genes (18) *sopB/sigD*, *ssaE*, *ssaG*, *ssaH*, *ssaI*, *ssaJ*, *ssaK*, *ssaL*, *ssaM*, *ssaN*, *ssaO*, *ssaQ*, *sscA*, *sseA*, *sseB*, *sseD*, *sseE* y *sseG* estuvieron ausentes del mismo genoma (UK61H_2017), *mig-14* y *pipB2* no se identificaron en el genoma MEX19F_2009, mientras que en el genoma CAN19H_2016 no se encontraron los genes *ssaU* y *steC*. Por otro lado, el gen *ratB* no se encontró en cuatro genomas obtenidos en Reino Unido en 2014 y 2016; el gen *sspH2* no se encontró en 10 genomas, de los cuales seis fueron de origen humano fueron obtenidos en México entre 2003 y 2004. La información relacionada con la función y localización de los genes de virulencia encontrados se muestra en la Tabla Suplementaria S4.

Con relación a la presencia/ausencia de genes particulares de acuerdo con la procedencia de las cepas, los genes *sodCI* y *sseI/srfH* en conjunto no se encontraron en 16 genomas de Estados Unidos, 15 de los cuales fueron obtenidos de cerdo. Adicionalmente, el gen *sseI/srfH* no se encontró en tres genomas de origen humano de México, Canadá y Reino Unido. Los genes *grvA*, *pefA*, *pefB*, *pefC*, *pefD*, *rck*, *spvB*, *spvC* y *spvR*, en conjunto se encontraron en los mismos 75 genomas obtenidos principalmente en países eurasiáticos. Por otro lado, el gen *shdA* solo se encontró en genomas obtenidos en Canadá y México de muestras de agua de río, bovino y humano. Los genes *gogB*, *grvA*, *pefA*, *pefB*, *pefC*, *pefD*, *rck*, *spvB*, *spvC* y *spvR* se identificaron en genomas de origen humano, alimentos, animal

silvestre, pollo y muestras no determinadas, pero el primero de estos se encontró también en genomas de origen bovino. Los genes antes mencionados no se encontraron en los genomas obtenidos en años anteriores al año 2000, ni en los años 2004 al 2006, a excepción de *rck* que, si se encontró en 2004. Es importante destacar que los genes *gogB*, *grvA*, *pefABCD*, *rck* y *spvBCR* no se encontraron en genomas obtenidos en México y Portugal, además *gogB* tampoco se encontró en genomas de Australia, pero *rck* si se encontró en México. Los genes *sodCI* y *sseI/srfH* no se encontraron en los genomas obtenidos en 1999 y 2006. Finalmente, el gen *sseK1* no fue encontrado en el genoma de origen equino.

Con base en la presencia/ausencia de los genes de virulencia se formaron 33 perfiles genéticos de virulencia (PGV), destacándose seis por su frecuencia, los cuales se muestran en la Tabla 2, el resto se describen en la Tabla Suplementaria S5. El PGV1 estuvo formado por 106 genes de virulencia, y se compartió por 116 genomas obtenidos en Norteamérica, dos genomas obtenidos en Portugal y nueve en Reino Unido. El PGV2 se formó por 116 genes y estuvo compartido por 59 genomas obtenidos en países de Eurasia y un genoma obtenido en Canadá, mayormente de origen humano. El PGV3 se compuso por 104 genes y se compartió por 13 genomas obtenidos en Estados Unidos entre 2002 y 2006, principalmente; 12 de los genomas fueron de origen porcino y uno de origen humano reportado en 2017. El PGV4 presentó 107 genes y se encontró en dos genomas de origen humano obtenidos en Canadá en 2008 y 2017 y en ocho genomas obtenidos en México. El PGV5 incluyó 115 genes y fue encontrado en ocho genomas de origen humano, mayormente, siete reportados en Reino Unido y uno en Australia entre 2014 y 2022. El PGV6 está formado por 105 genes y se presentó en siete genomas de origen humano, cinco obtenidos en México entre 2003 y 2004, y dos obtenidos en 2017 en Canadá y Australia.

De manera general, se dividieron los PGVs por el lugar donde fueron reportados los genomas. Los PGV Eurasiáticos fueron 14 y difieren entre sí por la presencia/ ausencia de los genes *entA*, *entB*, *gogB*, *ratB*, *rck*, *sipB/sspB*, *sipD*, *sopD2*, *sopE2*, *ssaV*, *sscB*, *sseC*, *sseF*, *sseI/srfH*, *sseK1* y *sspH2*; a excepción del PGV8 y el PGV23 que fueron más similares a los PGV norteamericanos. Los PGVs norteamericanos fueron 18, diez de los cuales difieren del PGV1 en la presencia/ausencia de los genes *mig-14*, *pipB2*, *sodCI*, *sopD2*, *ssaU*, *sseI/srfH*, *sseK1*, *sseK2*, *sseL*, *sspH2* y *steC*; mientras que seis PGV fueron diferentes del PGV1 por la presencia/ausencia de los genes *entE*, *escS*, *gogB*, *iucA*, *iucB*,

iucC, *iucD*, *iutA*, *rck* y *shdA*. Por otro lado, la principal diferencia entre los PGVs eurasiáticos y norteamericanos es que ninguno de los PGVs de Norteamérica tuvo en conjunto los genes *gogB*, *grvA* *pefA*, *pefB*, *pefC*, *pefD*, *rck*, *spvB*, *spvC* y *spvR*, mientras que ninguno de los PGVs eurasiáticos presentó los genes *entE*, *escS*, *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD*, *iutA* y *shdA* (Tabla 2).

Tabla 2. Perfiles genéticos de virulencia (PGVs) 1 al 6 de las cepas de *S. Typhimurium* genotipo ST213.

PGV	No. Genes	Genomas	Genes ¹
PGV1	106	127	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sodCI</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i> .
PGV2	116	60	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>gogB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>rck</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sodCI</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i> .
PGV3	104	13	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i> .
PGV4	107	10	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>shdA</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sodCI</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i> .
PGV5	115	8	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>grvA</i> , <i>mig-14</i> , <i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> , <i>pefD</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>rck</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sodCI</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>spvB</i> , <i>spvC</i> , <i>spvR</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i> .
PGV6	105	7	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>mig-14</i> , <i>pipB2</i> , <i>ratB</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipD</i> , <i>sodCI</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD2</i> , <i>sopE2</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>sseI/srfH</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>sseL</i> y <i>steC</i> .

¹ En esta tabla se excluyeron los genes que presentes en todos los genomas estudiados.

Patrones de agrupación con base en genes de virulencia en genomas ST213 a nivel global

Al utilizar como matriz para la generación de patrones de agrupamiento la presencia/ausencia de genes de virulencia en los genomas de estudio considerando el tipo de muestra, el mapa de calor muestra el agrupamiento en una ramificación de aquellos genomas obtenidos de muestras de agua y bovino. En otra rama independiente se agruparon, por un lado, los genomas obtenidos de muestras de animal silvestre, pollo,

alimentos y aquellos obtenidos de muestras no especificadas y, por otro lado, se agruparon aquellos genomas obtenidos de aves de corral, cerdo y canino (Figura 2).

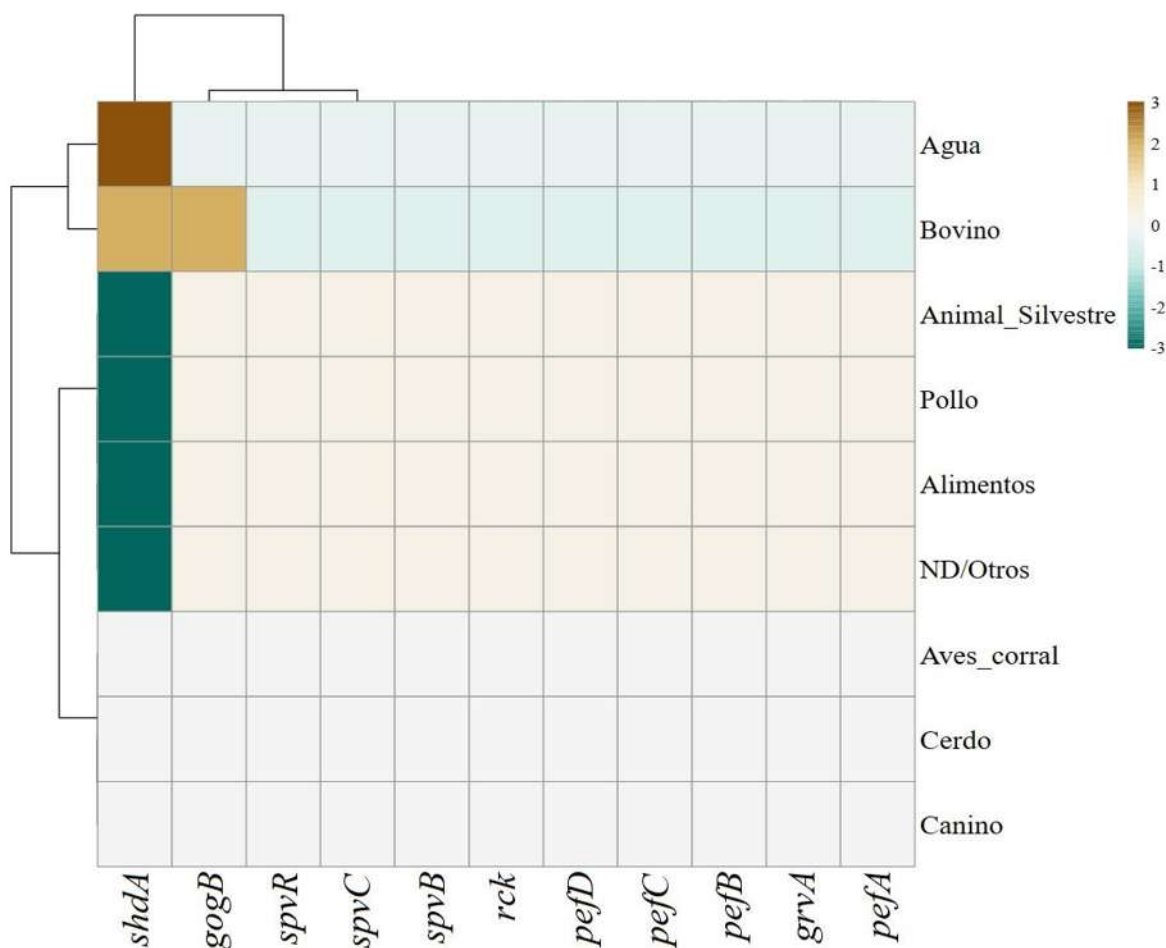


Figura 2. Patrón de agrupamiento por tipo de muestra de los genomas del genotipo ST213 con base en los genes de virulencia. Se pueden ver dos grupos definidos; sin embargo, en uno de ellos se concentran la mayoría de los tipos de muestra, separándose claramente solo las muestras de Suelo. Ver detalles en el texto.

Por otro lado, el patrón de agrupamiento generado cuando la información sobre la presencia/ausencia de genes de virulencia se combinó con el país en el cual se reportaron los genomas analizados, mostró a los genomas de México en una ramificación separada del resto de los genomas. Los genomas obtenidos en Australia formaron un grupo y los genomas restantes obtenidos formaron un solo grupo (Figura 3).

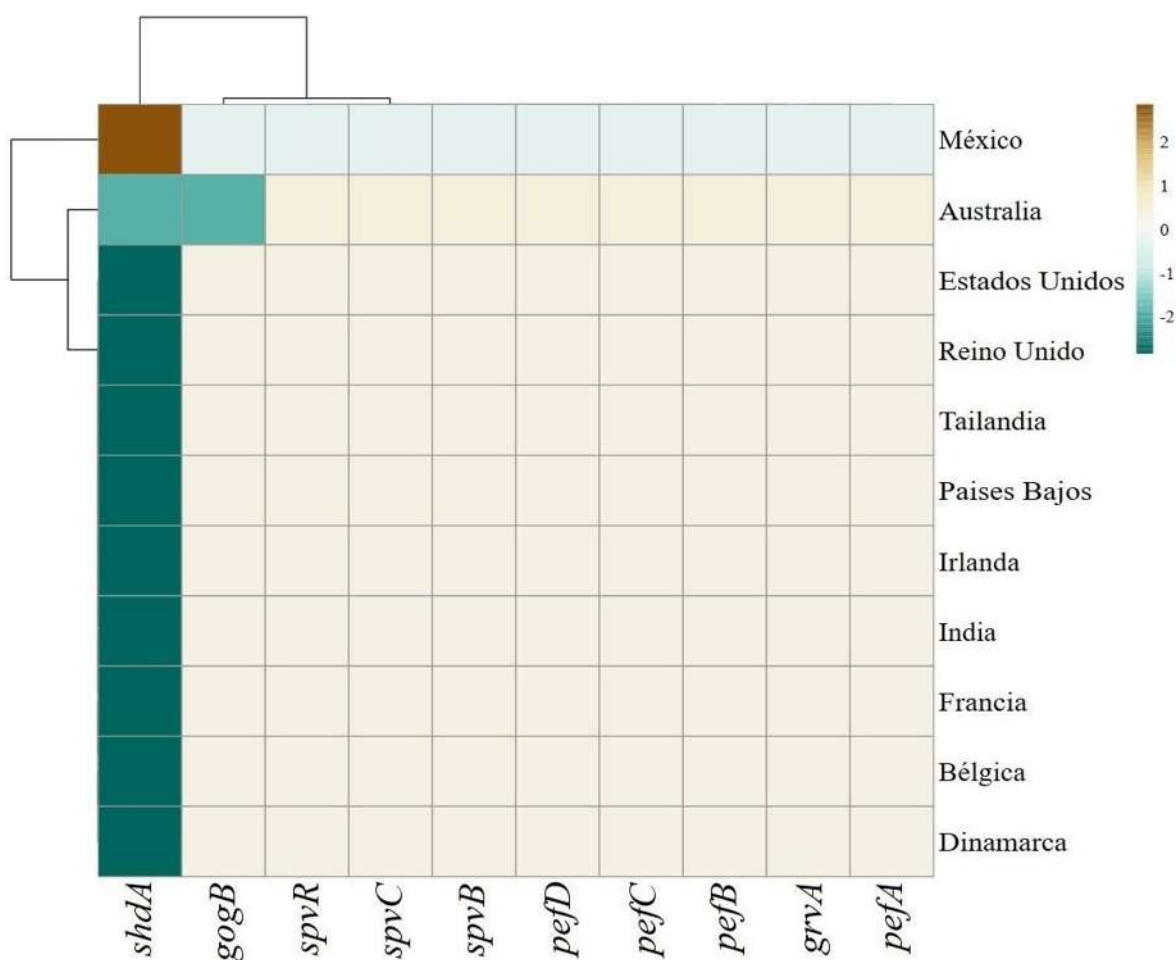


Figura 3. Patrón de agrupación de los genes de virulencia identificados en los genomas aquí analizados por país de origen. Se observaron los genomas de México y Australia en ramas separadas entre sí y del resto.

Finalmente, el patrón de agrupamiento del mapa de calor generado cuando la información sobre la presencia/ausencia de genes de virulencia se relacionó con la procedencia de las cepas cuyos genomas se analizaron, mostró dos ramas principales A y B. En A se agruparon 79 genomas obtenidos principalmente en Europa y Asia, incluyendo a cepas de Reino Unido (57), Dinamarca (6), Tailandia (3), India (3), Estados Unidos (2), Francia (2), Irlanda (2), Australia (1), Bélgica (1), Canadá (1) y Países Bajos (1). En B se agruparon 176 genomas de cepas obtenidas principalmente en Norteamérica, México (83), Estados Unidos (58), Canadá (20), Reino Unido (12), Portugal (2) y Australia (1). De manera interesante, el genoma UK61H_2017 se separó del resto de genomas sin formar parte de A o B (Figura 4).

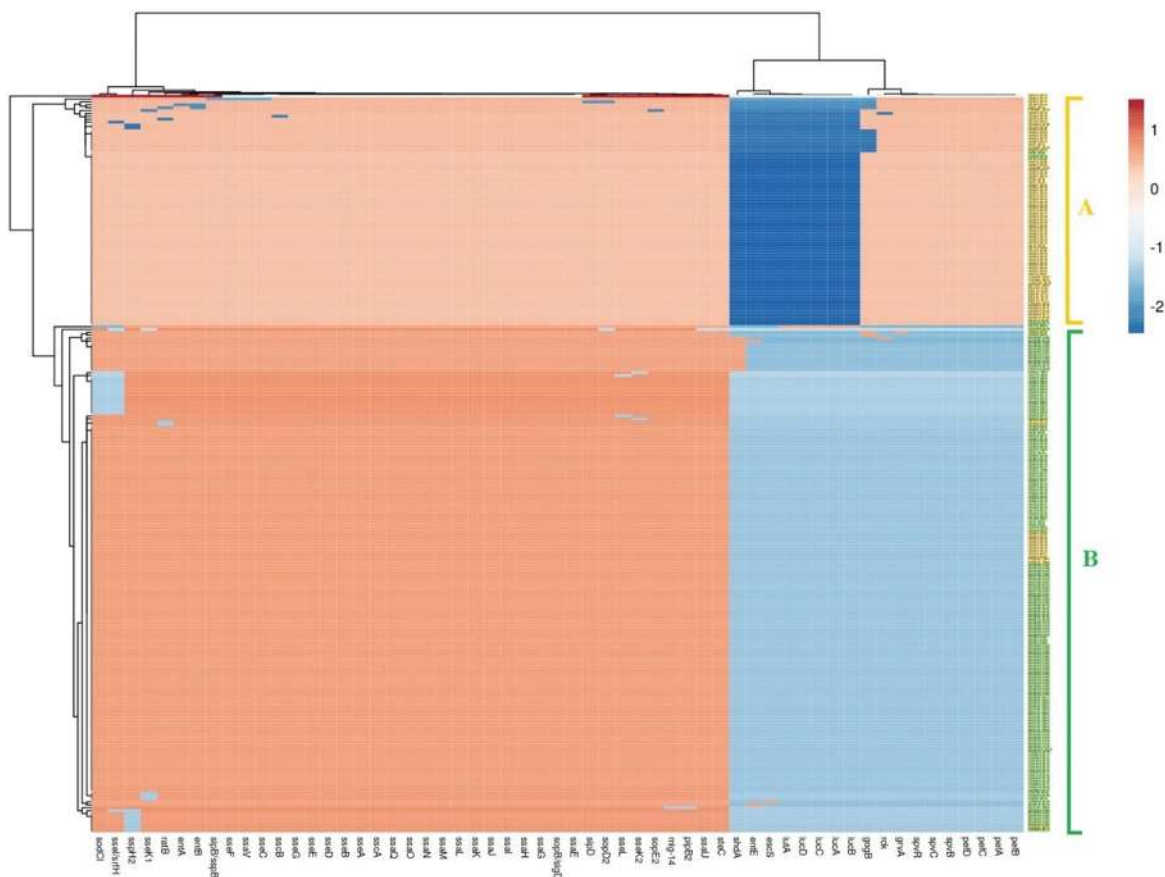


Figura 4. Patrón de agrupamiento de los genes de virulencia identificados en los genomas de las cepas de genotipo ST213 aquí analizados. Se pueden ver dos grupos definidos **A** y **B**; en A se agruparon genomas, en su mayoría, obtenidos en Eurasia, mientras que en B se agruparon, mayormente, genomas obtenidos en Norteamérica.

Filogenia datada del genotipo ST213 de S. Typhimurium

En la Figura 5 se muestra la filogenia datada de los genomas de las cepas del genotipo ST213 globales, las ramas principales aparecen colapsadas para facilitar la visualización del árbol. En el árbol filogenético se observan dos ramas principales, de las cuales surgen a su vez dos ramas. Uno de los clados muestra el genoma de una cepa de genotipo ST313 aislada en 2022 en México junto con el genoma de la cepa de referencia ATCC14028, de genotipo ST19. Ambas cepas se utilizaron como grupos externos para polarizar el árbol filogenético. De la otra rama se desprendieron dos clados generales que incluyen todos los genomas pertenecientes a la ST213 de *S. Typhimurium*, señalados como Clado I y Clado II.

La separación a partir de los tres genotipos aquí incluidos (ST19, ST313 y ST213) a partir de su ancestro común más reciente data alrededor del año 1818, con la probabilidad del 95% de la datación desde 1665 hasta 1910. Por otro lado, el ancestro común más

reciente para los clados I y II se fecha alrededor de 1873, con una probabilidad de datación del 95% entre 1815 hasta 1927, un rango de 112 años.

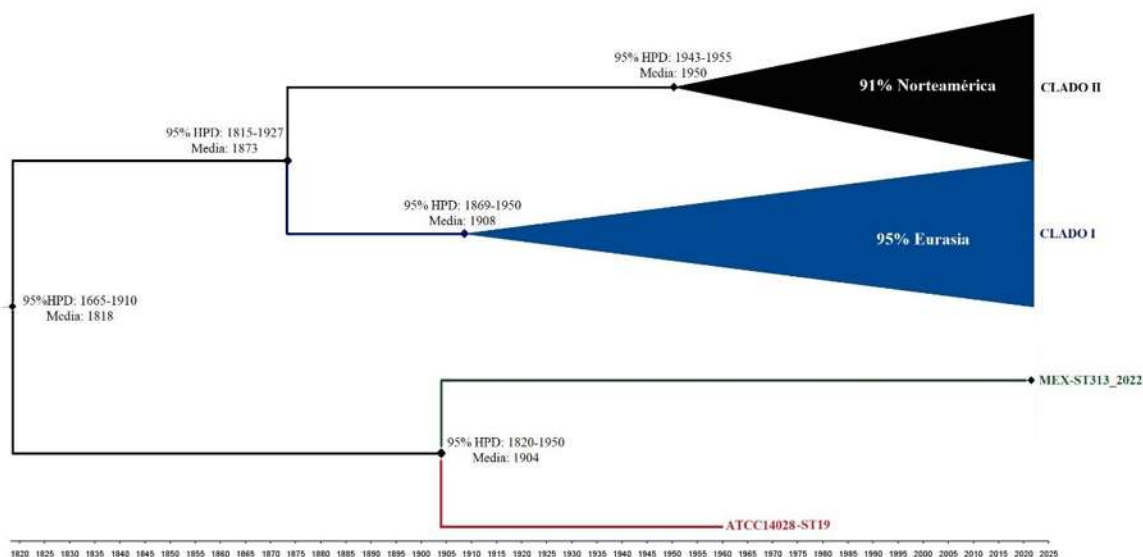


Figura 5. Filogenia datada colapsada de *S. Typhimurium* ST213. Se observaron dos clados bien definidos Clado I y Clado II.

La generación del Clado I puede datarse alrededor del año 1908 (95% HPD 1869-1950), y está formado por 80 genomas, aislados principalmente en países de Europa [Bélgica (1), Dinamarca (6), Francia (2), Irlanda (2), Países Bajos (1), Reino Unido (58)] y Asia [India (3), Tailandia (3)] y Oceanía [Australia (1)]. Aunque en este clado también se agrupan dos genomas de cepas aisladas en Estados Unidos de América (EUA) y uno de una cepa de Canadá. El Clado I está formado por dos grupos principales, IA e IB. El Grupo IA incluye a 20 genomas, 11 de ellos obtenidos a partir de cepas provenientes de muestras clínicas humanas. En este grupo se separa en una rama el genoma DEN01H_2002. La mayoría de los genomas fueron obtenidos de cepas aisladas en varios años posteriores a su posible origen. Al Grupo IB lo conformaron 60 genomas divididos en cuatro subgrupos. En el Subgrupo 1 (SG1) se encuentran cinco genomas, todos ellos de cepas de origen humano, tres aisladas en Dinamarca y dos en Reino Unido. El Subgrupo 2 (SG2) incluyó siete genomas de Reino Unido de cepas aisladas de muestras humanas. En el Subgrupo 3 (SG3) se incluyen 13 genomas, 11 obtenidos de cepas provenientes de muestras clínicas humanas, una de origen animal y una de alimentos. Están presentes 11 genomas obtenidos en Europa, uno en India y uno en EUA. El Subgrupo 4 (SG4) fue el más grande de este clado,

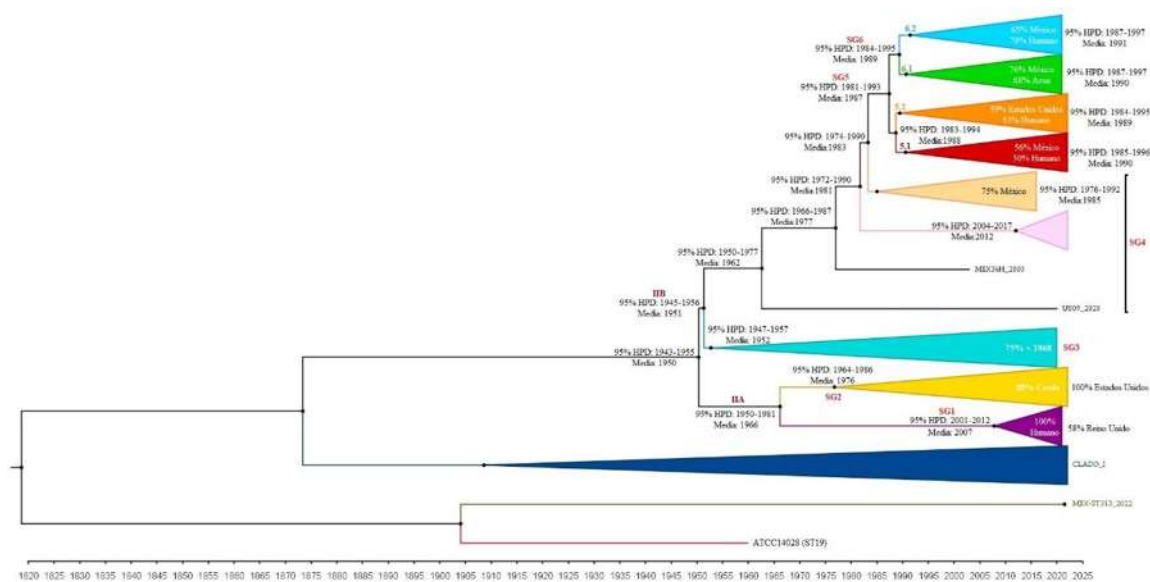


Figura 7. Filogenia datada con ramificaciones colapsadas del Clado II de *S. Typhimurium* ST213.
Ver texto para detalles.

El SG1 se formó por 12 genomas de cepas aisladas en Reino Unido y Canadá, el genoma UK12H_2021 se separó del resto en una rama. Todas las cepas de este grupo se aislaron de muestras humanas en la última década. El origen del SG1 puede datarse posterior al año 2005. El SG2 se conformó por 17 genomas de cepas obtenidas en Estados Unidos posteriormente a 1975, 15 de estos genomas fueron de cepas aisladas de cerdo y los otros dos fueron de cepas provenientes de canino y de humano. En este subgrupo se localizó a uno de los genomas de las cepas antiguos de este estudio (1988) junto con el de una de las más recientes (2022).

El Grupo IIB estuvo formado por cuatro subgrupos. En el SG3 se encuentran los tres genomas de las cepas de mayor antigüedad de aislamiento incluidas en este estudio, dos de Portugal (1965 y 1967) y una de los EUA (1957). En este subgrupo se incluyen dos genomas obtenidos de cepas aisladas de alimentos y dos de origen animal, y tres genomas muestran una fecha del aislamiento cercana a la fecha de su posible origen. En el SG4 se encuentran tres genomas que no se agrupan con otros, una rama en la que están dos genomas, uno de una cepa del Reino Unido y otro de una cepa de EUA. Además, se encuentra una rama que agrupa cuatro genomas, tres de cepas provenientes de México y uno de una cepa de EUA. El SG5 presentó dos ramificaciones principales (5.1 y 5.2). La ramificación 5.1 contiene 32 genomas, 16 de los cuales fueron de cepas de humano y el

resto de las cepas de origen variado. Los genomas de esta ramificación fueron obtenidos de cepas provenientes países de Norteamérica, a excepción de una proveniente del Reino Unido. La ramificación 5.2 contiene 32 genomas, de cepas aisladas en México y EUA principalmente, solo uno fue de una cepa aislada en Canadá. De estos genomas, 17 se obtuvieron de cepas aisladas de muestras humanas, ocho de origen animal, cuatro de alimentos y tres de muestras de agua. Al SG6 lo conformaron dos ramificaciones principales (6.1 y 6.2). En la ramificación 6.1 se ubicaron 25 genomas, 19 de cepas de México, 5 de EUA y 1 del Reino Unido. De estos, 17 genomas se obtuvieron de cepas aisladas de muestras de agua. Finalmente, la rama 6.2 estuvo formada por 46 genomas, 30 de los cuales fueron de cepas aisladas en México, nueve en EUA, cuatro en Canadá, dos en Reino Unido y una en Australia. Además, 36 genomas se obtuvieron de cepas aisladas de muestras humanas.

Dinámica de propagación del genotipo ST213 a nivel mundial

La dinámica de propagación, de acuerdo con el tipo muestra, identifica al ser humano como la principal fuente de transmisión de cepas de *S. Typhimurium* del genotipo ST213 a nivel mundial, seguida de los alimentos, bovinos y otras fuentes no definidas (Figura 8a). Se observa que los animales silvestres, las aves de corral, y en específico el pollo, juegan un papel menor en la transmisión del genotipo ST213, pero superior al equino y al agua de presa. Por otro lado, la dinámica de propagación entre los países muestra que México es el principal transmisor de cepas hacia Estados Unidos y Canadá. A su vez, Estados Unidos propaga el genotipo de regreso a México, siendo los países en los que se ve la dinámica de intercambio recíproco más pronunciada (Figura 8b). Además, estos tres países de Norteamérica, particularmente Estados Unidos y México, son los propagadores principales hacia el Reino Unido, convirtiéndose este último en el principal dispersor del genotipo hacia Europa y otras regiones del mundo.

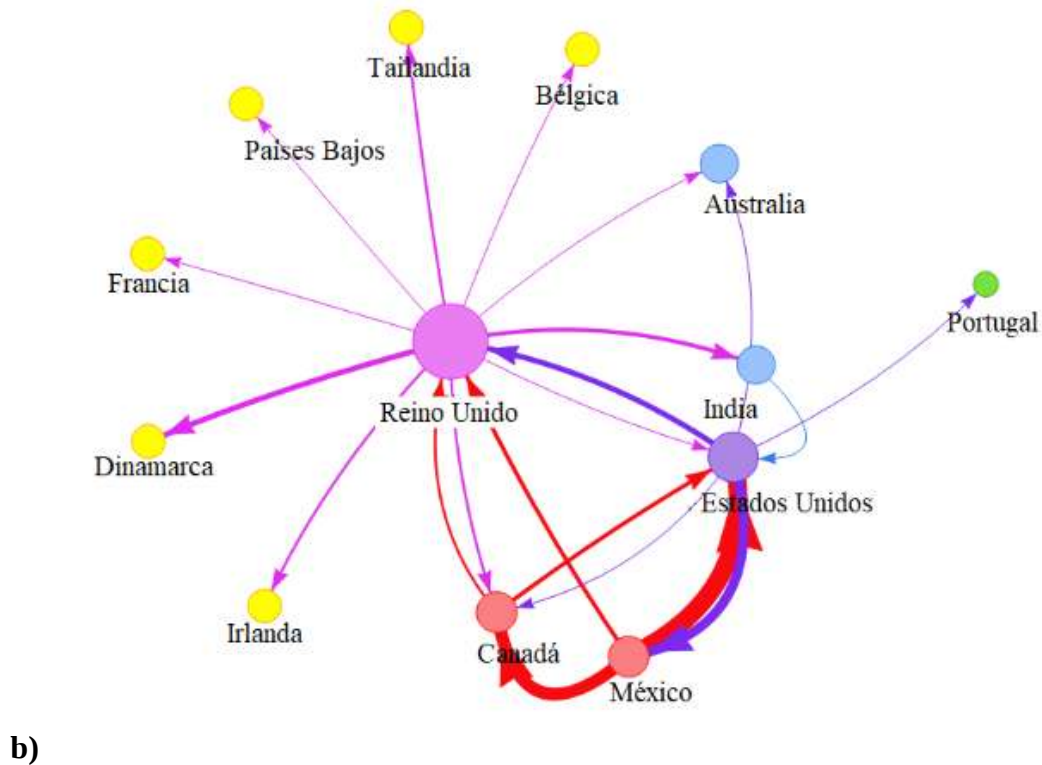
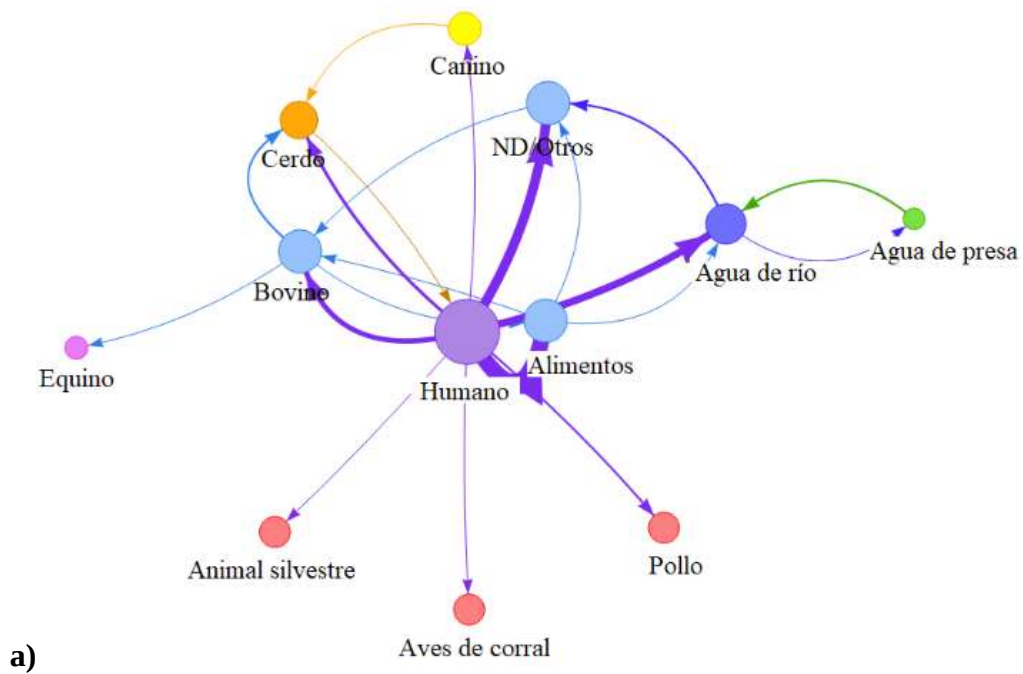


Figura 8. Red de transmisión global de *Salmonella* Typhimurium ST213. El tamaño de los nodos se escala según la métrica de cercanía. Las flechas reflejan la direccionalidad de la transición entre tipos de muestra. El grosor de las líneas y flechas representa la frecuencia de las transiciones (las flechas más gruesas reflejan más transiciones). **a)** Red de transmisión con base en el tipo de muestra y **b)** Red de transmisión con base en el lugar de origen.

Discusión

Desde el establecimiento de la serotipificación como método para diferenciar entre patotipos de *Salmonella enterica*, este ha permanecido por más de 80 años como la herramienta para el análisis de brotes y la vigilancia epidemiológica en dicho patógeno (Wattiau et al., 2011). Dicho método de tipificación fue útil al revelar la especialización o prevalencia de ciertos serotipos hacia hospederos particulares, o bien la presencia de serotipos generalistas, sin especialización por hospedero (Bäumler y Fang, 2013). La serotipificación todavía constituye un método útil para la vigilancia epidemiológica de *S. enterica* en lo que va del presente siglo (Galanis et al., 2006; Hendriksen et al., 2011; Cheng et al., 2019; Ferrari et al., 2019).

Desde el establecimiento de la secuenciación masiva de genomas, el análisis genómico comparativo de *S. enterica* y otros patógenos asociados a la contaminación de elementos se ha propuesto como una herramienta para la discriminación entre cepas de este patógeno (Besser, 2018; Brown et al., 2021). La aproximación genómica se usa ahora de manera rutinaria en *S. enterica* para diferenciar cepas asociadas a un brote de aquellas que no lo son (Leekitcharoenphon et al., 2014; Inns et al., 2017; Simon et al., 2018; Pijnacker et al., 2019; Hoff et al., 2022), para distinguir a un nivel más discriminatorio que la serotipificación entre genotipos especializados a un hospedero dentro de un mismo serotipo (Stevens y Kingsley, 2012), para el análisis poblacional y la relación entre genotipos (Alikhan et al., 2018), entre otras aplicaciones.

El análisis genómico comparativo realizado en el presente trabajo requería la reconstrucción del pangenoma de las cepas de estudio con la finalidad de poder realizar el análisis filogenético, la filogenia datada, y el estudio de los patrones de dispersión del genotipo ST213. El pangenoma procariótico se ha definido como el complemento total de genes que se encuentran dentro de una población (Ingle et al., 2021), o bien como la colección completa de familias de genes que se encuentran dentro de una especie determinada (McInerney et al., 2017), y se encuentra conformado por el genoma núcleo y el genoma accesorio. El genoma núcleo es el contenido genético compartido por todos los aislados analizados dentro de la población evaluada, o bien la colección de familias de genes presentes en todos los integrantes de la especie (McInerney et al., 2017; Ingle et al., 2021). Por su parte, el genoma accesorio corresponde al complemento de genes presentes

en cada genoma, que no se encuentran dentro del genoma núcleo (Ingle et al., 2021), y ha sido subdividido en dos categorías, el genoma “concha” (*shell genome*) y el genoma nube (*cloud genome*). Se considera a los genes en el *shell genome* como aquellos moderadamente comunes, que muestran frecuencias intermedias, mientras que los genes que componen el *cloud genome* se encuentran en frecuencias muy bajas, o bien son específicos de un genoma (Koonin y Wolf, 2008). Recientemente se ha propuesto una subdivisión del genoma accesorio basada en las frecuencias de genes en linajes individuales, no en todo el conjunto de genomas estudiados, lo que genera hasta 12 clases de genoma accesorio (Horeh et al., 2021).

El pangenoma de *S. enterica* se construyó inicialmente con 35 genomas disponibles de 19 serotipos distintos de la subespecie *enterica*, así como de las subespecies *arizonae* y *bongori* (Jacobsen et al., 2011), y en dicho trabajo pionero ya se observaba una diferencia entre el contenido genómico de cepas que no necesariamente correlacionaba con el serotipo. Sin embargo, en este primer trabajo no se proporciona el tamaño del pangenoma ni del genoma núcleo en términos de Mpb, sino en número de genes por familias de genes. Posteriormente se reconstruyó el pangenoma del serotipo Agona con los genomas de 73 aislados, encontrándose un genoma núcleo no-recombinante de 4.2 Mb (Zhou et al., 2013). Este estudio reveló que el método de tipificación mediante Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE), considerado hasta entonces el de elección para la tipificación de *S. enterica*, es una técnica de baja resolución para definir brotes y que el genoma núcleo del serotipo contenía pocos genes relacionados con la capacidad de infección, además de los de resistencia a antibióticos. Además, se encontró que cada brote analizado estaba relacionado con un clado particular, y que la mayoría de la diversidad genética dentro del serotipo era el reflejo del contenido diferencial en el genoma accesorio, o debida a recombinación, y era neutral. Recientemente se reconstruyó un pangenoma de *S. enterica* empleando 4 939 genomas disponibles al momento en bases de datos públicas pertenecientes a distintos serotipos, determinándose un pangenoma de un tamaño de 25.3 Mpb, un genoma núcleo estricto de 1.5 Mpb, pero un genoma núcleo de 3.2 Mbp presente al menos en el 96% de los genomas (Laing et al., 2017). Dicho estudio mostró características genómicas específicas de subespecies y serotipos de *S. enterica*.

En el presente trabajo se encontró que el pangenoma global de las cepas del genotipo ST213 es de 10.34 Mpb, lo que representa aproximadamente el 40% del pangenoma de la especie previamente calculado (Laing et al., 2017). El genoma núcleo global de este genotipo resultó de 4.02 Mpb, valor similar al del genoma núcleo del serotipo Agona previamente reportada y mayor al calculado para la especie. Estos contrastes indican que, a nivel del genotipo o serotipo, el tamaño del genoma núcleo se incrementa debido a la relación cercana de las cepas comparadas, por lo que mantienen un juego de genes compartidos mayor que cuando se comparan cepas de distintos serotipos o genotipos en contraste con el genoma núcleo de la especie que incluye a todos los serotipos/genotipos en el que se comparten menos genes en el genoma núcleo. Aunque los pangenomas y genomas núcleo de otros de los genotipos ST19 y ST313 se ha calculado para la realización de análisis filogenético basado en SNPs del genoma núcleo, dichos estudios no proporcionan el tamaño del pangenoma, el genoma núcleo y el genoma accesorio en términos de Mpb, sino únicamente en número de genes y SNPs (Okoro et al., 2015; Hammarlöf et al., 2018; Seribelli et al., 2020). Por lo anterior, no es posible comparar los resultados aquí obtenidos con los de dichos trabajos previos a nivel de genotipo mediante ST.

Los modelos actuales del pangenoma establecen que aquellas especies o poblaciones bacterianas en las cuales el genoma accesorio es grande y el genoma núcleo relativamente pequeño son generalistas que pueden ocupar diversos nichos, mantienen diversas interacciones dentro de una comunidad y poseen tamaños de poblaciones grandes (Brockhurst et al., 2019; Ingle et al., 2021). En contraste, aquellas especies o poblaciones con genomas núcleo relativamente grandes y genomas accesorios pequeños, se consideran especialistas de nicho, con interacciones comunitarias limitadas y un tamaño de población pequeño. De manera interesante, el genoma accesorio del genotipo ST213 varía por regiones en 44% (México), 47% (Europa, Asia, Oriente) y el 53% (Norteamérica) del pangenoma, y a nivel global representa el 61.1%. Esto implica que el tamaño del genoma accesorio en el genotipo ST213 es prácticamente la mitad del pangenoma, o en todo caso no presenta diferencias significativas en tamaño con el genoma núcleo. Así, los tamaños relativos del genoma núcleo y el genoma accesorio del genotipo ST213 aquí encontrados, no parecen ajustarse plenamente a la diferenciación entre generalista/especialista

previamente mencionada. No obstante, la presencia del genotipo ST213 en distintos tipos de muestra como las documentadas en este trabajo, y su aislamiento y rápida dispersión a diferentes regiones del mundo desde su reporte, sugieren que el genotipo ST213 se asocia más con un generalista que con un especialista. Además, se observa que al considerar la población global del genotipo ST213 de acuerdo con los genomas disponibles, el tamaño del pangenoma aumenta. Por lo que es posible que dicha tendencia corrobore el estatus del genotipo ST213 como generalista.

La gran mayoría de diferencias entre cepas en el genoma núcleo están asociadas con sustituciones de un solo nucleótido (SNPs). Se ha considerado que la mayoría de SNPs no-sinónimos del genoma núcleo tienen un bajo impacto en la función de la proteína codificada, aunque se ha propuesto de manera alternativa que si pueden generar cambios en la función de la proteína que no están sujetos a presión selectiva (Branchu et al., 2018). No obstante, el impacto de los SNPs no parece ser homogéneo dentro de los genes del genoma núcleo. Se ha documentado que el genoma núcleo de *S. Typhimurium* puede dividirse en dos grupos de genes, un grupo pequeño de genes (aprox. el 5%) muy variable y una gran mayoría de genes (aprox. el 98%) altamente conservado (Leekitcharoenphon et al., 2012). Mientras que en los genes altamente conservados del genoma núcleo se observa una selección contra SNPs que originan un cambio de aminoácidos en la proteína codificada, en el grupo de genes variables se observa una selección para el cambio de aminoácidos. La media de la relación dN/dS para genes conservados y para aquellos altamente variables es 1.0 y 1.25, respectivamente. Así, los cambios de aminoácidos en genes altamente variables del genoma núcleo podrían deberse a un aumento en la selección positiva en algunos sitios. De ser cierto esto a nivel de genotipo, sería interesante analizar cuáles genes del genoma núcleo están sujetos a presión selectiva para modificar las proteínas codificantes en el genotipo ST213, y si dicha presión selectiva se asocia a estrés ambiental o dentro del hospedero.

Las modificaciones en el genoma accesorio de bacterias están asociadas a la pérdida y ganancia de genes mediante proceso de transferencia horizontal (HGT) (Brockhurst et al., 2019; Kirchberger et al., 2020). En *S. Typhimurium* el genoma accesorio de distintos linajes está fuertemente asociado con la adquisición de genes de profagos y elementos integrativos (Bawn et al., 2020), y la presencia de estos y otros elementos móviles se ha

asociado a la especificidad por hospedero en *S. Typhimurium*. Por ejemplo, cepas del genotipo ST313 que causan infecciones sistémicas en el África sub-Sahariana portan profagos específicos, plásmidos crípticos y plásmidos de virulencia con una composición de genes específicos no encontrados en cepas que no infectan al ser humano (Branchu et al., 2018). Por otra parte, la presencia en el genoma accesorio de genes de baja frecuencia o únicos de cepa son indicio de HGT y pueden reflejar el intercambio de elementos móviles entre especies, o bien su selección en ambientes específicos (Horesch et al., 2021; Ingle et al., 2021; Cummins et al., 2022). Aunque en el presente trabajo no se evaluó específicamente la presencia de elementos genéticos móviles, la detección de algunos genes de virulencia indica la presencia de plásmidos o fagos específicos. Por ejemplo, los genes *spvB* y *spvC* que forman parte del Sistema de Secreción Tipo III (T3SS) se localizan específicamente en el plásmido pSLT. Dichos genes se encontraron principalmente en cepas de Europa y Asia, estando prácticamente ausente en las cepas de Norteamérica. Es posible que el genotipo ST213 haya adquirido dicho plásmido en Europa, particularmente en Inglaterra, y de ahí haya migrado a Asia, de acuerdo con el patrón de dispersión propuesto por la filogenia datada. Por otra parte, estos genes se encontraron en cepas provenientes de todo tipo de muestra analizada, por lo que no parece estar asociado a un ambiente u hospedero particular. La localización de otros genes codificados en dicho plásmido, como los genes *pfl* y *rck*, fortalece dicha hipótesis. De manera interesante el gen *grvA* que se encuentra codificado en el fago lisogénico Gifsy-2 mostró una presencia y distribución similar a la de los genes codificados en el plásmido pSLT. Esta co-distribución de ambos elementos genéticos móviles sugiere una ruta de adquisición y dispersión común dentro del genotipo ST213 cuyas implicaciones ecológicas, evolutivas y de salud pública tendrán que ser analizada con mayor detalle a futuro. Sin embargo, es importante resaltar que el patrón de distribución de genes de virulencia distingue prácticamente de la misma forma que la filogenia datada entre las cepas de Norteamérica de las cepas europeas y asiáticas.

Como se mencionó anteriormente, la filogenia datada obtenida para las cepas globales del genotipo ST213 muestra una clara separación en dos clados, uno de Norteamérica y otro Euroasiático, con una fecha estimada del ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés) de dichos clados en 1873, que sería el año estimado del

surgimiento del genotipo. El rango de años de la aparición del MRCA en el que cae el 95% de la más alta densidad de probabilidad (*highest probability density*, HPD) es entre 1815 y 1927, un rango de 112 años. Un periodo similar de años en el que se encuentra el 95% de HPD se ha observado para datar el ancestro común más reciente de cepas de *S. Typhimurium* que infectan aves passeriformes, datado en 1840 con un 95% HPD, entre 1784 y 1887, es decir 103 años (Fu et al., 2022a). Aunque calibraciones posteriores reducen este periodo a 85 años (Fu et al. 2022b). En casos como la datación del MRCA de cepas de linajes del serotipo Anatum asociadas a ganado bovino en granjas de Nueva York, se data en 1836, y se establece un 95% HPD entre 540–1978, es decir un periodo bastante inexacto de 1,438 años (Carroll et al., 2021). Así, el periodo que comprende el 95% HPD puede considerarse bastante aceptable. Hasta donde sabemos, el presente trabajo y los anteriormente citados de Fu et al. (2022a, b) son aquellos en los que se establecen las dataciones más antiguas de surgimiento de linajes dentro de *S. Typhimurium* y, de manera interesante, en ambos trabajos los años de datación del MCA son bastante cercanos, 1840 y 1873. Esta comparación de trabajos representa de alguna manera un factor de confiabilidad en nuestra datación, ya que se usaron diferentes genomas y estrategias de datación. Ese periodo de 33 años (1840-1873) parece marcar eventos de variación genómica en *S. Typhimurium*, cuyo origen y extensión aún están por determinarse.

De manera interesante, aunque el surgimiento reciente del genotipo ST213 se reporta en México y la filogenia datada aquí obtenida indica claramente una dispersión posterior a Norteamérica y de ahí a Europa, particularmente el reino Unido, los resultados muestran que el Clado I Euroasiático del genotipo ST213 emergió primero, aproximadamente en 1908, mientras que el Clado II surge en 1950. Los valores de 95% HPD de dichos clados caen en periodos de 80 y 12 años, respectivamente, por lo que las dataciones de los MRCAs son significativamente más precisas que las del MCRA del genotipo ST213. La formación de sublinajes conforme se avanza hacia el presente reduce aún más los periodos de dentro de los que se ubican los valores de 95% HPD. Los resultados anteriores sugieren que el genotipo ST213 emergió en Europa, y que permaneció sin ser un genotipo predominante en salud pública, por lo menos hasta donde inician los estudios de MLST como método de tipificación de *S. enterica*. Por razones que no son claras, la filogenia datada sugiere que la relevancia epidemiológica actual y la dispersión

global reciente del genotipo ST213 se presenta en México y de ahí se expande a USA y Canadá. La presencia de cepas de USA en el clado Euroasiático sugiere que un evento de migración o movilización de dicho país hacia el Reino Unido inicia la dispersión del genotipo ST213 en Europa. De la misma manera, procesos de migración o movilización de población del Reino Unido hacia otros países europeos y hacia Asia, particularmente India, han favorecido la dispersión del genotipo ST213 hacia dichos continentes. La cadena de transmisión generada por país de procedencia de las cepas refuerza dicho proceso epidemiológico del genotipo ST213. Esta información puede ser útil para hacer trabajo retrospectivo con cepas que se encuentren en colecciones de instituciones de salud pública de cada país, aisladas en las fechas que la filogenia datada aquí construida establece como ingreso a ciertos países y regiones. Esto permitirá definir a un nivel más fino los procesos epidemiológicos y de dispersión del genotipo ST213, y establecer su relevancia en la salud pública y su asociación con brotes en cada región/país en las que únicamente se ha reportado el serotipo.

Con relación a los procesos de dispersión del genotipo ST213 por tipo de muestra, las cadenas de transmisión aquí elaboradas reafirman el papel relevante en salud pública de la contaminación humano-alimento-humano de *S. enterica* en general, y del serotipo Typhimurium en particular (Antunes et al., 2020; Pires et al., 2021). No obstante, el papel de esa conocida dinámica de transmisión debe reevaluarse a nivel regional y local, a la luz de distintos factores emergidos en las últimas décadas y todavía no bien estudiados. Uno de esos factores es, por ejemplo, el papel del cambio climático en los brotes ocasionados por la contaminación de alimentos (Lake, 2017; Lake y Barker, 2018; Semenza et al., 2022). Otro factor de consideración reciente en los procesos de transmisión y dispersión de patógenos es el papel de la evolución de las técnicas de detección de contaminación en las cadenas de producción. Ya que las técnicas genético-moleculares modernas de detección de patógenos permiten un mejor entendimiento de las fuentes asociadas al surgimiento de brotes (Fegan y Jenson, 2018) y permiten el diseño de protocolos para patotipos específicos (Alegbeleye y Sant'Ana, 2020; Zhang et al., 2022). En ese sentido, es deseable el diseño de sistemas de detección específicos del genotipo ST213 con base en el análisis de genomas completos, como el realizado en este trabajo.

Conclusión

La serotipificación ha permanecido como método para diferenciar entre patotipos de *Salmonella enterica* por más de 80 años; sin embargo, el análisis genómico comparativo de *S. enterica* y otros patógenos asociados a la contaminación de elementos se ha propuesto como una herramienta para la discriminación entre cepas de este patógeno. Es así, que en este trabajo al considerar la población global disponible del genotipo ST213, el aumento en el tamaño del pangenoma y del genoma núcleo, así como la variación por regiones del genoma accesorio sugiere que el genotipo ST213 se asocia más como un patógeno generalista que como especialista. Por otra parte, la presencia en el genoma accesorio de genes de baja frecuencia o únicos de cepa son indicio de HGT y pueden reflejar el intercambio de elementos móviles entre especies, o su selección en ambientes específicos. El patrón de distribución de genes de virulencia distingue entre las cepas de Norteamérica de las cepas europeas y asiáticas, de igual manera la filogenia datada del genotipo ST213 muestra una clara separación en dos clados, uno de Norteamérica y otro Euroasiático, con una fecha estimada del surgimiento del genotipo ST213 en 1873. Los resultados obtenidos sugieren que el genotipo ST213 emergió en Europa, y que no fue un genotipo de relevancia en salud pública, hasta que se presentó en México y de ahí se expandió a USA y Canadá por razones que no son claras. Por otro lado, las cadenas de transmisión reafirman el papel relevante en salud pública de la contaminación humano-alimento-humano de *S. enterica* en general, y del serotipo Typhimurium en particular. No obstante, el papel de esa dinámica de transmisión debe reevaluarse regional y localmente, a la luz de distintos factores emergidos en las últimas décadas y todavía no bien estudiados.

Referencias bibliográficas

- Achtman, M., Van den Broeck, F., Cooper, K. K., Lemey, P., Parker, C. T., Zhou, Z., ATCC14028s Study Group. (2021). Genomic population structure associated with repeated escape of *Salmonella enterica* ATCC14028s from the laboratory into nature. *PLoS Genetics*. 17(9): e1009820. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009820>.
- Achtman, M., Zhou, Z., Charlesworth, J., Baxter, L. (2022). EnteroBase: hierarchical clustering of 100 000s of bacterial genomes into species/subspecies and populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 377(1861): 20210240. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0240>.
- Alegbeleye, O. O., Sant'Ana, A. S. (2020). Pathogen subtyping tools for risk assessment and management of produce-borne outbreaks. *Current Opinion in Food Science*. 32: 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.007>.
- Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J., Achtman, M. (2018). A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genetics*. 14(4): e1007261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007261>.
- Antunes, P., Novais, C., Peixe, L. (2020). Food-to-humans bacterial transmission. *Microbiology Spectrum*. 8(1): <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-201>.
- Bäumler, A., Fang, F. C. (2013). Host specificity of bacterial pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3(12): a010041. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010041>.
- Bawn, M., Alikhan, N. F., Thilliez, G., Kirkwood, M., Wheeler, N. E., Petrovska, L., Dallman, T. J., Adriaenssens, E. M., Hall, N., Kingsley, R. A. (2020). Evolution of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation. *PLoS Genetics*. 16(6): e1008850. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008850>.
- Besser, J. M. (2018). *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*. 71: 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>.
- Biek, R., Pybus, O. G., Lloyd-Smith, J. O., Didelot, X. (2015). Measurably evolving pathogens in the genomic era. *Trends in Ecology & Evolution*. 30(6): 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.03.009>.
- Biswas, S., Li, Y., Elbediwi, M., Yue, M. (2019). Emergence and dissemination of *mcr*-carrying clinically relevant *Salmonella* Typhimurium monophasic clone ST34. *Microorganisms*. 7(9): 298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090298>.
- Branchu, P., Bawn, M., Kingsley, R. A. (2018). Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infection and Immunity*. 86(8): e00079-18. <https://doi.org/10.1128/iai.00079-18>.
- Brockhurst, M. A., Harrison, E., Hall, J. P., Richards, T., McNally, A., MacLean, C. (2019). The ecology and evolution of pangenomes. *Current Biology*. 29(20): R1094–R1103. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.012>.
- Brown, E. W., Bell, R., Zhang, G., Timme, R., Zheng, J., Hammack, T. S., Allard, M. W. (2021). *Salmonella* genomics in public health and food safety. *EcoSal Plus*. 9(2): eESP-0008. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2020>.

- Carroll, L. M., Buehler, A. J., Gaballa, A., Siler, J. D., Cummings, K. J., Cheng, R. A., Wiedmann, M. (2021). Monitoring the microevolution of *Salmonella enterica* in healthy dairy cattle populations at the individual farm level using whole-genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*. 12: 763669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.763669>.
- Cheng, R. A., Eade, C. R., Wiedmann, M. (2019). Embracing diversity: differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>.
- Croucher, N. J., Page, A. J., Connor, T. R., Delaney, A. J., Keane, J. A., Bentley, S. D., Parkhill, J., Harris, S. R. (2015). Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Research*. 43(3): e15–e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>.
- Cummins, E. A., Hall, R. J., McInerney, J. O., McNally, A. (2022). Prokaryote pangenomes are dynamic entities. *Current Opinion in Microbiology*. 66: 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.01.005>.
- de Bernardi-Schneider, A., Ford, C. T., Hostager, R., Williams, J., Cioce, M., Çatalyürek, Ü. V., Wertheim, J. O., Janies, D. (2020). StrainHub: a phylogenetic tool to construct pathogen transmission networks. *Bioinformatics*. 36(3): 945–947. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz646>.
- De Cesare, A. (2018). *Salmonella* in foods: a reemerging problem. *Advances in Food and Nutrition Research*. 86: 137–179. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.007>.
- Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Clifton, S. W., Weinstock, G. M., McClelland, M. (2013). Evolutionary genomics of *Salmonella enterica* subspecies. *MBio*. 4(2): e00579–12. <https://doi.org/10.1128/mbio.00579-12>.
- Dos Santos, A. M., Ferrari, R. G., Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*. 76: 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>.
- du Plessis, L., Stadler, T. (2015). Getting to the root of epidemic spread with phylodynamic analysis of genomic data. *Trends in Microbiology*. 23(7): 383–386. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.04.007>.
- Fegan, N., Jenson, I. (2018). The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? *Meat Science*. 144: 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.018>.
- Feng, Y., Zou, S., Chen, H., Yu, Y., Ruan, Z. (2021). BacWGSTdb 2.0: a one-stop repository for bacterial whole-genome sequence typing and source tracking. *Nucleic Acids Research*. 49(D1): D644–D650. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa821>.
- Ferrari, R. G., Rosario, D. K., Cunha-Neto, A., Mano, S. B., Figueiredo, E. E., Conte-Junior, C. A. (2019). Worldwide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(14): e00591–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00591-19>.
- Fu, Y., M'ikanatha, N. M., Dudley, E. G. (2022a). Comparative genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from passerines reveals two lineages circulating in Europe, New Zealand, and the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 88(9): e00205–22. <https://doi.org/10.1128/aem.00205-22>.

- Fu, Y., Smith, J. C., Shariat, N. W., M'ikanatha, N. M., Dudley, E. G. (2022b). Evidence for common ancestry and microevolution of passerine-adapted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the UK and USA. *Microbial Genomics*. 8(2): 000775. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000775>.
- Galanis, E., Wong, D. M. L. F., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F. J., Wegener, H. C., World Health Organization Global Salm-Surv (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 12(3): 381. <https://doi.org/10.3201/eid1203.050854>.
- Grenfell, B. T., Pybus, O. G., Gog, J. R., Wood, J. L., Daly, J. M., Mumford, J. A., Holmes, E. C. (2004). Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science*. 303(5656): 327–332. <https://doi.org/10.1126/science.1090727>.
- Hammarlöf, D. L., Kröger, C., Owen, S. V., Canals, R., Lacharme-Lora, L., Wenner, N., Schager, A. E., Wells, T. J., Henderson, I. R., Wigley, P., Hokamp, K., Feasey, N. A., Gordon, M. A., Hinton, J. C. (2018). Role of a single noncoding nucleotide in the evolution of an epidemic African clade of *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 115(11): E2614–E2623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714718115>.
- Hendriksen, R. S., Vieira, A. R., Karlsmose, S., Lo Fo Wong, D. M., Jensen, A. B., Wegener, H. C., Aarestrup, F. M. (2011). Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(8): 887–900. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>.
- Hernández-Díaz, E. A., Vázquez-Garcidueñas, M. S., Negrete-Paz, A. M., Vázquez-Marrufo, G. (2022). Comparative genomic analysis discloses differential distribution of antibiotic resistance determinants between worldwide strains of the emergent ST213 genotype of *Salmonella* Typhimurium. *Antibiotics*. 11(7): 925. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070925>.
- Hoff, C., Nichols, M., Gollarza, L., Scheftel, J., Adams, J., Tagg, K. A., Francois Watkins, L., Poissant, T., Stapleton, G. S., Morningstar-Shaw, B., Signs, K., Bidol, S., Donovan, D., Basler, C. (2022). Multistate outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to pet hedgehogs, United States, 2018–2019. *Zoonoses and Public Health*. 69(3): 167–174. <https://doi.org/10.1111/zph.12904>.
- Horesh, G., Taylor-Brown, A., McGimpsey, S., Lassalle, F., Corander, J., Heinz, E., Thomson, N. R. (2021). Different evolutionary trends form the twilight zone of the bacterial pan-genome. *Microbial Genomics*. 7(9): <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000670>.
- Ingle, D. J., Howden, B. P., Duchene, S. (2021). Development of phylodynamic methods for bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*. 29(9): 788–797. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.02.008>.
- Inns, T., Ashton, P. M., Herrera-Leon, S., Lighthill, J., Foulkes, S., Jombart, T., Rehman, Y., Fox, A., Dallman, T., DE Pinna, E., Browning, L., Coia, J. E., Edeghere, O., Vivancos, R. (2017). Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiology & Infection*. 145(2): 289–298. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001941>.

- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aarestrup, F. M., Ussery, D. W., Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microbial Ecology*. 62: 487–504. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9880-1>.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., Jermini, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14(6): 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>.
- Key, F. M., Posth, C., Esquivel-Gomez, L. R., Hübner, R., Spyrou, M. A., Neumann, G. U., Furtwängler, A., Sabin, S., Burri, M., Wissgott, A., Lankapalli, A. K., Vågene, Å. J., Meyer, M., Nagel, S., Tukhbatova, R., Khokhlov, A., Chizhevsky, A., Hansen, S., Belinsky, A. B., Kalmykov, A., ... Krause, J. (2020). Emergence of human-adapted *Salmonella enterica* is linked to the Neolithization process. *Nature Ecology & Evolution*. 4(3): 324–333. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1106-9>.
- Kirchberger, P. C., Schmidt, M. L., Ochman, H. (2020). The ingenuity of bacterial genomes. *Annual Review of Microbiology*. 74: 815–834. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115822>.
- Kirkwood, M., Vohra, P., Bawn, M., Thilliez, G., Pye, H., Tanner, J., Chintoan-Uta, C., Branchu, P., Petrovska, L., Dallman, T., Hall, N., Stevens, M. P., Kingsley, R. A. (2021). Ecological niche adaptation of *Salmonella* Typhimurium U288 is associated with altered pathogenicity and reduced zoonotic potential. *Communications Biology*. 4(1): 498. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02013-4>.
- Koonin, E. V., Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*. 36(21): 6688–6719. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn668>.
- Laing, C. R., Whiteside, M. D., Gannon, V. P. (2017). Pan-genome analyses of the species *Salmonella enterica*, and identification of genomic markers predictive for species, subspecies, and serovar. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01345>.
- Lake, I. R. (2017). Food-borne disease and climate change in the United Kingdom. *Environmental Health*. 16 (Suppl 1): 53–59. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0327-0>.
- Lake, I. R., Barker, G. C. (2018). Climate change, foodborne pathogens and illness in higher-income countries. *Current Environmental Health Reports*. 5: 187–196. <https://doi.org/10.1007/s40572-018-0189-9>.
- Lee, H., Yoon, Y. (2021). Etiological agents implicated in foodborne illness world wide. *Food Science of Animal Resources*. 41(1): 1–7. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e75>.
- Leekitcharoenphon, P., Lukjancenko, O., Friis, C., Aarestrup, F. M., Ussery, D. W. (2012). Genomic variation in *Salmonella enterica* core genes for epidemiological typing. *BMC Genomics*. 13(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-88>.
- Leekitcharoenphon, P., Nielsen, E. M., Kaas, R. S., Lund, O., Aarestrup, F. M. (2014). Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PloS One*. 9(2): e87991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087991>.
- Li, W., Li, Y., Liu, Y., Shi, X., Jiang, M., Lin, Y., Qiu, Y., Zhang, Q., Chen, Q., Zhou, L., Sun, Q., Hu, Q. (2017). Clonal expansion of biofilm-forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with multidrug-resistance phenotype in the Southern coastal region of China. *Frontiers in Microbiology*. 8: 2090. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02090>.

- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., Yang, J. (2022). VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*. 50(D1): D912–D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>.
- McInerney, J. O., McNally, A., O'Connell, M. J. (2017). Why prokaryotes have pangenomes. *Nature Microbiology*. 2(4): 1–5. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.40>.
- Metsalu, T., Vilo, J. (2015). ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Research*. 43(W1): W566–W570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv468>.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*. 37(5): 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
- Misiou, O., Koutsoumanis, K. (2022). Climate change and its implications for food safety and spoilage. *Trends in Food Science & Technology*. 126: 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.031>.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., ... (2012). Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature Genetics*. 44(11): 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>.
- Okoro, C. K., Barquist, L., Connor, T. R., Harris, S. R., Clare, S., Stevens, M. P., Arends, M. J., Hale, C., Kane, L., Pickard, D. J., Hill, J., Harcourt, K., Parkhill, J., Dougan, G., Kingsley, R. A. (2015). Signatures of adaptation in human invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 populations from sub-Saharan Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9(3): e0003611. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003611>.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pangenome analysis. *Bioinformatics*. 31(22): 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>.
- Panzenhagen, P. H. N., Paul, N. C., Junior, C. A. C., Costa, R. G., Rodrigues, D. P., Shah, D. H. (2018). Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. *International Journal of Medical Microbiology*. 308(2): 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.005>.
- Payne, M., Octavia, S., Luu, L. D. W., Sotomayor-Castillo, C., Wang, Q., Tay, A. C. Y., Sintchenko, V., Tanaka, M. M., Lan, R. (2021). Enhancing genomics-based outbreak detection of endemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using dynamic thresholds. *Microbial Genomics*. 7(6): 000310. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000310>.
- Petit, R. A., 3rd, Read, T. D. (2020). Bactopia: A flexible pipeline for complete analysis of bacterial genomes. *mSystems*. 5(4), e00190-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00190-20>.
- Pijnacker, R., Dallman, T. J., Tijmsma, A. S., Hawkins, G., Larkin, L., Kotila, S. M., Amore, G., Amato, E., Suzuki, P. M., Denayer, S., Klammer, S., Pászti, J., McCormick, J., Hartman, H., Hughes, G. J., Brandal, L. C. T., Brown, D., Mossong, J., Jernberg, C., Müller, L., ... International Outbreak Investigation Team. (2019). An international outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis linked to eggs from Poland: a

- microbiological and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 19(7): 778–786. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30047-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30047-7).
- Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., Gobena, T., Majowicz, S. E., Hald, T., Hoejskov, P. S., Minato, Y., Devleeschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: Think global, act local. *Current Opinion in Food Science*. 39: 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>.
- Pulford, C. V., Perez-Sepulveda, B. M., Canals, R., Bevington, J. A., Bengtsson, R. J., Wenner, N., Rodwell, E. V., Kumwenda, B., Zhu, X., Bennett, R. J., Stenhouse, G. E., Malaka De Silva, P., Webster, H. J., Bengoechea, J. A., Dumigan, A., Tran-Dien, A., Prakash, R., Banda, H. C., Alufandika, L., Mautanga, M. P., ... Hinton, J. C. (2021). Stepwise evolution of *Salmonella* Typhimurium ST313 causing bloodstream infection in Africa. *Nature Microbiology*. 6(3): 327–338. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00836-1>.
- Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J. M., Hernández, M. (2019). TORMES: an automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 35(21), 4207–4212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz220>.
- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*. 2(1): vew007. <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>.
- Rieux, A., Balloux, F. (2016). Inferences from tip-calibrated phylogenies: a review and a practical guide. *Molecular Ecology*. 25(9), 1911–1924. <https://doi.org/10.1111/mec.13586>.
- Ruan, Z., Yu, Y., Feng, Y. (2020). The global dissemination of bacterial infections necessitates the study of reverse genomic epidemiology. *Briefings in Bioinformatics*. 21(2): 741–750. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz010>.
- Semenza, J. C., Rocklöv, J., Ebi, K. L. (2022). Climate change and cascading risks from infectious disease. *Infectious Diseases and Therapy*. 11(4): 1371–1390. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00647-3>.
- Seribelli, A. A., Gonzales, J. C., de Almeida, F., Benevides, L., Cazentini Medeiros, M. I., dos Prazeres Rodrigues, D., de C Soares, S., Allard, M. W., Falcão, J. P. (2020). Phylogenetic analysis revealed that *Salmonella* Typhimurium ST313 isolated from humans and food in Brazil presented a high genomic similarity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51: 53–64. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00155-6>.
- Simon, S., Trost, E., Bender, J., Fuchs, S., Malorny, B., Rabsch, W., Prager, R., Tietze, E., Flieger, A. (2018). Evaluation of WGS based approaches for investigating a food-borne outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Derby in Germany. *Food Microbiology*. 71: 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.017>.
- Sintchenko, V., Holmes, E. C. (2015). The role of pathogen genomics in assessing disease transmission. *BMJ*. 350: <https://doi.org/10.1136/bmj.h1314>.
- Stevens, M. P., Kingsley, R. A. (2021). *Salmonella* pathogenesis and host-adaptation in farmed animals. *Current Opinion in Microbiology*. 63: 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.05.013>.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*. 4(1): vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.

- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C. (2014). The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* Typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PLoS One*. 9(11): e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>.
- Sun, H., Wan, Y., Du, P., Bai, L. (2020). The epidemiology of monophasic *Salmonella* Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*. 17(2): 87–97. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2676>.
- Wattiau, P., Boland, C., Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(22): 7877–7885. <https://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>.
- Wiesner, M., Zaidi, M. B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J. J., Silva, C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiology*. 9(1): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>.
- Wiesner, M., Calva, E., Fernández-Mora, M., Cevallos, M. A., Campos, F., Zaidi, M. B., Silva, C. (2011). *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiology*. 11(1): 9 <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-9>.
- Zhang, R., Yang, T., Zhang, Q., Liu, D., Elhadidy, M., Ding, T. (2022). Whole-genome sequencing: a perspective on sensing bacterial risk for food safety. *Current Opinion in Food Science*. 47: 100888. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100888>.
- Zhou, Z., McCann, A., Litrup, E., Murphy, R., Cormican, M., Fanning, S., Brown, D., Guttman, D. S., Brisse, S., Achtman, M. (2013). Neutral genomic microevolution of a recently emerged pathogen, *Salmonella enterica* serovar Agona. *PLoS Genetics*. 9(4): e1003471. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003471>.

Material Suplementario

Tabla S1. Metadatos de las cepas de *S. Typhimurium* ST213 analizadas en este trabajo, previamente no reportadas en Hernández-Díaz et al. (2022).

Código LGMM	No. Acceso	Tipo de muestra	Año	País
US55_2022	SRR18326799	ND/Otros	2022	Estados Unidos
US56_2022	SRR19171853	ND/Otros	2022	Estados Unidos
US57Eq_2022	SRR19396458	Equine	2022	Estados Unidos
US58B_2022	SRR17518187	Bovino	2021	Estados Unidos
US59B_2022	SRR17720341	Bovino	2021	Estados Unidos
US60S_2022	SRR22383363	Cerdo	2022	Estados Unidos
MEX14F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX15F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX16F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX17F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX18F_2008	PRJNA802840	Alimentos	2008	México
MEX19F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX20F_2008	PRJNA802840	Alimentos	2008	México
MEX21F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX22F_2009	PRJNA802840	Alimentos	2009	México
MEX23F_2011	PRJNA802840	Alimentos	2011	México
MEX68R_2020	SRR18517463	Agua/Río	2020	México
MEX69R_2021	SRR18544685	Agua/Río	2021	México
MEX70R_2021	SRR18544710	Agua/Río	2021	México
MEX71R_2021	SRR18544717	Agua/Río	2021	México
MEX72R_2021	SRR18544718	Agua/Río	2021	México
MEX73B_2021	SRR20081726	Bovino	2021	México
MEX74R_2021	SRR21786912	Agua/Río	2021	México
MEX75R_2021	SRR21786918	Agua/Río	2021	México
MEX76R_2019	SRR22230420	Agua/Río	2019	México
MEX77R_2019	SRR22230367	Agua/Río	2019	México
MEX78R_2020	SRR22230231	Agua/Río	2020	México
MEX79R_2019	SRR22229564	Agua/Río	2019	México
MEX80R_2020	SRR22228159	Agua/Río	2020	México
MEX81R_2020	SRR22228155	Agua/Río	2020	México
MEX82R_2020	SRR22228152	Agua/Río	2020	México
MEX83R_2020	SRR22234204	Agua/Río	2020	México
UK65H_2022	SRR19325064	Humano	2022	Reino Unido
UK66H_2022	SRR17713547	Humano	2022	Reino Unido
UK67H_2022	SRR19601522	Humano	2022	Reino Unido
UK68H_2022	SRR19973677	Humano	2022	Reino Unido
UK69H_2022	SRR21608882	Humano	2022	Reino Unido
UK70H_2022	SRR21535224	Humano	2022	Reino Unido

Nota. ST – Secuencia Tipo, Código_LGMM – Código interno del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana.

Tabla S2. Parámetros de calidad de los genomas ensamblados en este trabajo y obtenidos de las bases de datos de cepas del genotipo ST213 de *S. Typhimurium* aisladas en México, previamente no reportadas en Hernández-Díaz et al. (2022).

Código LGMM	Access No.	ST	No. Contigs	Genome Length	Largest Contig	Avg Contigs Length	N ₅₀	GC
MEX14F_2009	PRJNA802840	213	69	4845819	621554	9008.03	175184	52.08
MEX15F_2009	PRJNA802840	213	36	4799962	714664	19851.78	301237	52.15
MEX16F_2009	PRJNA802840	213	64	5132286	881896	13779.63	259009	51.87
MEX17F_2009	PRJNA802840	213	34	4924086	881344	25921.88	301228	52.03
MEX18F_2008	PRJNA802840	213	51	4961687	700153	13728.49	283075	52.1
MEX19F_2009	PRJNA802840	213	48	4991223	690570	14386.88	282543	52.09
MEX20F_2008	PRJNA802840	213	38	4965399	872543	22961.66	298066	52.05
MEX21F_2009	PRJNA802840	213	50	5020395	875226	17504.52	282876	52.09
MEX22F_2009	PRJNA802840	213	44	4877413	786859	17883.16	283075	51.97
MEX23F_2011	PRJNA802840	213	126	5033426	309052	2452.79	102488	52.06
MEX68R_2020	SRR18517463	213	55	5060198	497657	9048.31	282543	51.85
MEX69R_2021	SRR18544685	213	40	4936825	819130	20478.25	376541	52.02
MEX70R_2021	SRR18544710	213	39	4815462	778337	19957.36	321224	52.12
MEX71R_2021	SRR18544717	213	50	5008651	881346	17626.92	376541	52.12
MEX72R_2021	SRR18544718	213	39	4815013	778521	19962.08	301228	52.12
MEX73B_2021	SRR20081726	213	65	5093678	497917	7660.26	282543	51.91
MEX74R_2021	SRR21786912	213	57	4982175	964068	16913.47	301490	52.04
MEX75R_2021	SRR21786918	213	59	4982849	819457	13889.10	364216	52.04
MEX76R_2019	SRR22230420	213	55	4841194	888701	16158.20	376801	52.13
MEX77R_2019	SRR22230367	213	56	4841530	1054616	18832.43	394003	52.13
MEX78R_2020	SRR22230231	213	61	4911619	888517	14565.85	265101	52.11
MEX79R_2019	SRR22229564	213	55	4952176	881057	16019.22	324878	52.02
MEX80R_2020	SRR22228159	213	48	4851796	881828	18371.42	320588	52.11
MEX81R_2020	SRR22228155	213	50	4883953	779023	15580.46	272910	52.09
MEX82R_2020	SRR22228152	213	54	4886664	881261	16319.65	301484	52.09
MEX83R_2020	SRR22234204	213	63	4853279	667294	10591.97	241598	52.11
UK65H_2022	SRR19325064	213	61	4763338	377148	78087.51	167589	52.24
UK66H_2022	SRR17713547	213	61	4808048	294421	78820.46	138876	52.21
UK67H_2022	SRR19601522	213	77	4916616	432019	63852.16	223301	52.12
UK68H_2022	SRR19973677	213	49	4707820	484249	96077.96	222757	52.15
UK69H_2022	SRR21608882	213	54	4782840	410007	88571.11	223511	52.22
UK70H_2022	SRR21535224	213	75	4827711	377358	64369.48	178254	52.21
US55_2022	SRR18326799	213	50	4962035	699084	99240.70	213554	52.22
US56_2022	SRR19171853	213	69	5053178	881407	73234.46	406626	52.02
US57EQ_2022	SRR19396458	213	144	4914571	224456	34128.97	63521	52.25
US58B_2022	SRR17518187	213	47	4934361	881345	104986.40	304584	52.17
US59B_2022	SRR17720341	213	71	4915064	424357	69226.25	168211	52.19
US60S_2022	SRR22383363	213	99	4948445	496207	49984.29	193504	52.07

NOTA: AVG_CONTIGS_LENGTH – AVERAGE CONTIG LENGTH

Tabla S3. Frecuencia de los genes de virulencia identificados en los genomas ST213 de *S. Typhimurium* incluidos en este estudio.

Genes de virulencia	Frecuencia %
<i>avrA, csgA, csgB, csgC, csgD, csgE, csgF, csgG, fepC, fepG, fimC, fimD, fimF, fimH, fimI, invA, invB, invC, invE, invF, invG, invH, invI, invJ, lpfA, lpfB, lpfC, lpfD, lpfE, mgtB, mgtC, misL, ompA, orgA, orgB, orgC, pipB, prgH, prgI, prgJ, prgK, sicA, sicP, sifA, sifB, sinH, sipA/sspA, sipC/sspC, slrP, sopA, sopD, spaO, spaP, spaQ, spaR, spaS, spiC/ssaB, sptP, ssaC, ssaD, ssaP, ssaR, ssaS, ssaT, sseJ, steA y steB.</i>	100% (n=256)
<i>entA, mig-14, pipB2, sipB/sspB, sipD, sopB/sigD, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, sscA, sseA, sseB, sseD, sseE, sseG y steC</i>	99.6% (n=255)
<i>entB, sopD2, ssaV, sscB, sseC, sseF, sseK2 y sseL</i>	99.2% (n=254)
<i>ratB</i>	98.4% (n=252)
<i>sseK1</i>	98% (n=251)
<i>sspH2</i>	96% (n=246)
<i>sodCI</i>	93.7% (n=240)
<i>sseI/srfH</i>	92.5% (n=237)
<i>grvA</i>	31.2% (n=80)
<i>pefA, pefB, pefC, pefD, rck, spvB, spvC y spvR</i>	30.9% (n=79)
<i>gogB</i>	26.9% (n=69)
<i>shdA</i>	4.6% (n=12)
<i>entE</i>	0.7% (n=2)
<i>escS, iucA, iucB, iucC, iucD e iutA</i>	0.3% (n=1)

Tabla S4. Genes de virulencia identificados en los genomas analizados

Producto	Función	Genes	Codificado
Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)	Inyecta al menos 13 proteínas efectoras a través de la membrana plasmática de la célula hospedera, la mayoría de las cuales están involucradas en los reordenamientos del citoesqueleto de actina, lo que lleva a la alteración de la membrana y la invasión de <i>Salmonella</i> .	<i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>invB</i> , <i>invC</i> , <i>invE</i> , <i>invF</i> , <i>invG</i> , <i>invH</i> , <i>invI</i> , <i>invJ</i> , <i>orgA</i> , <i>orgB</i> , <i>orgC</i> , <i>prgH</i> , <i>prgI</i> , <i>prgJ</i> , <i>prgK</i> , <i>sicA</i> , <i>sicP</i> , <i>sipA/sspA</i> , <i>sipB/sspB</i> , <i>sipC/sspC</i> , <i>sipD</i> , <i>slrP</i> , <i>sopA</i> , <i>sopB/sigD</i> , <i>sopD</i> , <i>sopE2</i> , <i>spaO</i> , <i>spaP</i> , <i>spaQ</i> , <i>spaR</i> , <i>spaS</i> , <i>sptP</i> , <i>sspH1</i> , <i>steA</i> y <i>steB</i>	Isla de Patogenicidad I (SPI-I)
Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)	Secreta proteínas efectoras para facilitar la replicación de bacterias intracelulares dentro de vacuolas que contienen <i>Salmonella</i> unidas a la membrana (SCV).	<i>gogB</i> , <i>pipB</i> , <i>pipB2</i> , <i>sifA</i> , <i>sifB</i> , <i>sopD2</i> , <i>spiC/ssaB</i> , <i>ssaC</i> , <i>ssaD</i> , <i>ssaE</i> , <i>ssaG</i> , <i>ssaH</i> , <i>ssaI</i> , <i>ssaJ</i> , <i>ssaK</i> , <i>ssaL</i> , <i>ssaM</i> , <i>ssaN</i> , <i>ssaO</i> , <i>ssaP</i> , <i>ssaQ</i> , <i>ssaR</i> , <i>ssaS</i> , <i>ssaT</i> , <i>ssaU</i> , <i>ssaV</i> , <i>sscA</i> , <i>sscB</i> , <i>sseA</i> , <i>sseB</i> , <i>sseC</i> , <i>sseD</i> , <i>sseE</i> , <i>sseF</i> , <i>sseG</i> , <i>ssel/srfH</i> , <i>sseJ</i> , <i>sseK1</i> , <i>sseK2</i> , <i>ssel</i> , <i>sspH2</i> y <i>steC</i>	Isla de Patogenicidad II (SPI-II)
Sistema de Secreción Tipo III (T3SS)	SpvB: media la despolimerización de actina asociada con la acumulación de células en la fase G2/M. Apoptosis. SpvC: Efecto fosfotreonina liasa	<i>spvB</i> , <i>spvC</i>	Plásmido pSLT
Proteína reguladora de la familia LysR	Regula los genes <i>spvABCD</i> .	<i>spvR</i>	Plásmidos grandes o en cromosomas de algunos serotipos de <i>Salmonella</i>
Agf [fimbrias agregadas delgadas (o curli)]	Ayuda a adherirse a las vellosidades de los enterocitos y también hace que las bacterias se adhieran entre sí.	<i>csgA</i> , <i>csgB</i> , <i>csgC</i> , <i>csgD</i> , <i>csgE</i> , <i>csgF</i> y <i>csgG</i>	Cromosoma
Lpf (fimbrias polares largas)	Chaperonas. Media la adherencia a las placas de Peyer.	<i>lpfA</i> , <i>lpfB</i> , <i>lpfC</i> , <i>lpfD</i> y <i>lpfE</i>	Cromosoma
Adhesina de la matriz extracelular	Implicada en la colonización intestinal.	<i>misL</i>	Cromosoma
Chaperonas	Median la unión de las bacterias a las microvellosidades de los enterocitos.	<i>pefA</i> , <i>pefB</i> , <i>pefC</i> y <i>pefD</i>	Plásmido pSLT
Factores putativos de colonización intestinal	Participa en la colonización y persistencia intestinal.	<i>ratB</i> , <i>shdA</i> y <i>sinH</i>	Isla de Patogenicidad CS54
Proteína de membrana	Confiere resistencia sérica al unirse al factor H del complemento humano.	<i>Rck</i>	Plásmido pSLT
Fimbrias Tipo I	La adhesina fimH media la captación independiente de T3SS1 en murinos.	<i>fimC</i> , <i>fimD</i> , <i>fimF</i> , <i>fimH</i> y <i>fimI</i>	Cromosoma

Enterobactinas	En <i>Escherichia coli</i> : Captación de hierro: el sideróforo enterobactina importado a través del receptor FepA y el sistema FepBCDG.	<i>entA</i> , <i>entB</i> , <i>entE</i> , <i>fepC</i> y <i>fepG</i>	Cromosoma
Transportador de Magnesio (hipotético)	MgtC es esencial para la supervivencia intracelular ni para la virulencia	<i>mgtB</i> y <i>mgtC</i>	Cromosoma
Regulador Global de Virulencia A	En una situación de tipo silvestre, GrvA disminuye la patogenicidad del serotipo Typhimurium en el hospedero.	<i>grvA</i>	Fago lisogénico Gifsy-2
Proteína asociada a la membrana interna	Mig-14 es necesaria para la proliferación bacteriana en el hígado y el bazo.	<i>mig-14</i>	Cromosoma
Proteína A de la membrana externa	Persistencia y supervivencia de <i>A. baumannii</i> . Ayuda a la formación de biopelículas y la motilidad de la superficie.	<i>ompA</i>	Cromosoma
Superóxido dismutasa	Contribuir a la supervivencia durante la fase sistémica de la infección.	<i>sodCI</i>	Fago lisogénico Gifsy-2.

Tabla S5. Perfiles genéticos de virulencia (PGVs) 7 al 33 de las cepas de *S. Typhimurium* genotipo ST213.

PGV	No. Genes	Genomas	Genes ¹
PGV7	105	3	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV8	105	2	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV9	115	2	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL y steC.</i>
PGV10	84	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopD2, sopE2, ssaU, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV11	101	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK2, sseL y sspH2.</i>
PGV12	103	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK1, sseK2, sspH2 y steC.</i>
PGV13	103	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK1, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV14	104	1	<i>entA, entB, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV15	104	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK1, sseK2, sseL, y steC.</i>
PGV16	105	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV17	105	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sspH2 y steC.</i>
PGV18	107	1	<i>entA, entB, escS, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV19	107	1	<i>entA, entB, entE, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, ssaU, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV20	107	1	<i>entA, entB, gogB, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO,</i>

			<i>ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV21	108	1	<i>entA, entB, entE, mig-14, pipB2, ratB, shdA, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV22	108	1	<i>entA, entB, mig-14, pipB2, ratB, rck, shdA, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV23	108	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV24	109	1	<i>entA, entB, iucA, iucB, iucC, iucD, iutA, mig-14, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sopB/sigD, sopD2, sopE2, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV25	111	1	<i>entA, entB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseD, sseE, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV26	113	1	<i>grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV27	113	1	<i>entA, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV28	113	1	<i>entA, entB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sodCI, sopB/sigD, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV29	114	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV30	115	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV31	115	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV32	115	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, rck, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV,</i>

			<i>sscA, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>
PGV33	115	1	<i>entA, entB, gogB, grvA, mig-14, pefA, pefB, pefC, pefD, pipB2, ratB, sipB/sspB, sipD, sodCI, sopB/sigD, sopD2, sopE2, spvB, spvC, spvR, ssaE, ssaG, ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM, ssaN, ssaO, ssaQ, ssaU, ssaV, sscA, sscB, sseA, sseB, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sseI/srfH, sseK1, sseK2, sseL, sspH2 y steC.</i>

¹ En esta tabla se excluyeron los genes que presentes en todos los genomas estudiados.

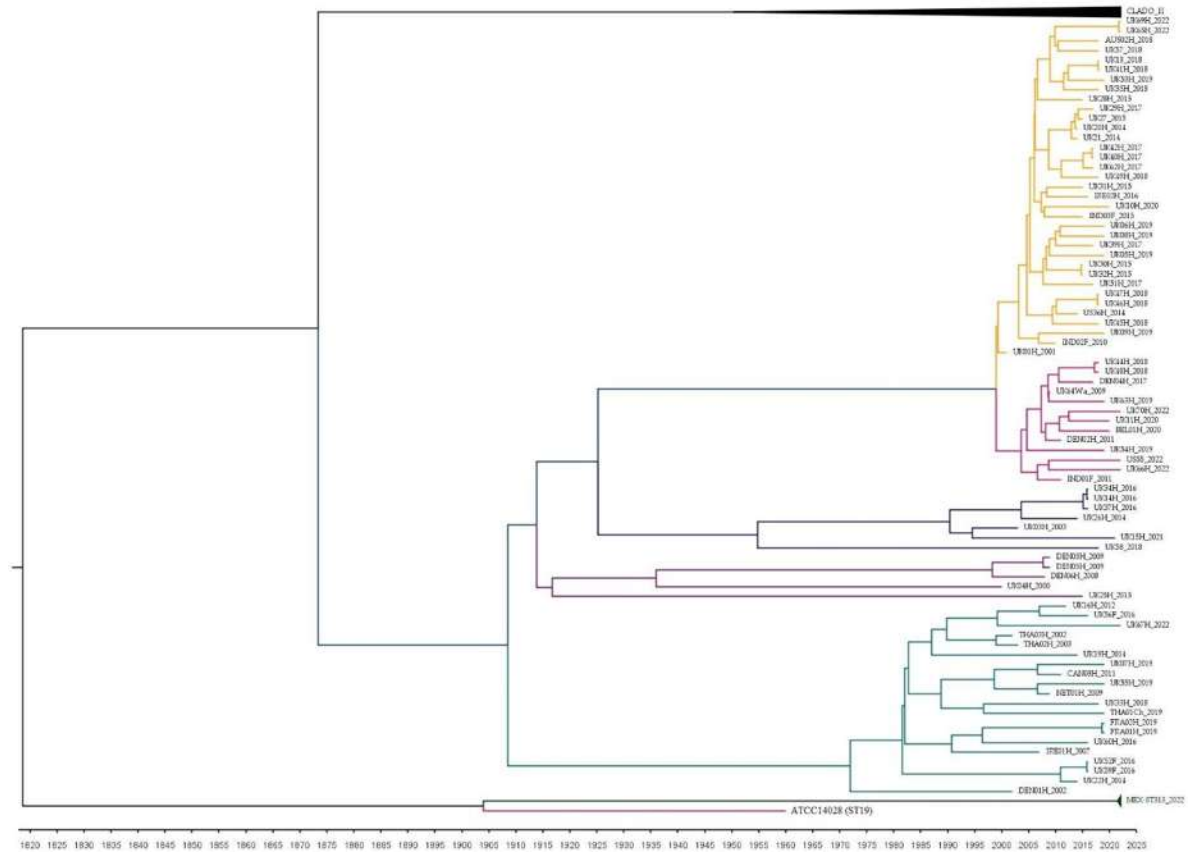


Figura S1. Clado I de la filogenia datada de *Salmonella* Typhimurium ST213 global.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Salmonella enterica constituye un problema de salud pública mundial, particularmente el serotipo Typhimurium que se aísla con frecuencia de muestras humanas, animales, alimentarias y ambientales, siendo la Secuencia Tipo 19 (ST19), considerada el genotipo fundador dentro del serotipo, la más ampliamente distribuida en todo el mundo. Desde hace 80 años la serotipificación ha sido el principal método para diferenciar patotipos de *Salmonella enterica*, siendo útil para la vigilancia epidemiológica y el análisis de brotes (Wattiau et al., 2011); sin embargo, desde el establecimiento de la secuenciación masiva de genomas, el análisis genómico comparativo de *S. enterica* se ha propuesto como la herramienta más efectiva para la discriminación entre cepas de este patógeno (Besser, 2018; Brown et al., 2021). La mayoría de los estudios epidemiológicos en cepas de *S. enterica* se han centrado en las diferencias entre serotipos o dentro de un serotipo, siendo escasos los estudios para analizar la variación intragenotipo. En ese sentido destacan los estudios realizados en los genotipos ST313 y ST34 de *S. Typhimurium* reemplazando al genotipo ancestral ST19, en los cuales se han identificado diferencias intragenotípicas para la formación de subgrupos clonales de relevancia epidemiológica y elaborando patrones de distribución de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos (Kingsley et al., 2009; Okoro et al., 2012; Sun et al., 2014; Mather et al., 2018). En México se ha reportado el genotipo ST213 como emergente asociado a un proceso de desplazamiento del genotipo fundador ST19 (Wiesner et al., 2009); sin embargo, son pocos los estudios al respecto, por lo que hasta donde hemos podido documentar, este trabajo es el primero en realizar un análisis comparativo para evaluar las diferencias genómico-epidemiológicas entre cepas de los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* serotipo Typhimurium de México y entre cepas del genotipo ST213 de diferentes regiones del mundo. Se identificaron aquí determinantes genómicos de relevancia en salud pública del genotipo emergente ST213.

Los genomas y sus metadatos asociados obtenidos de bases de datos públicas y analizados en el presente trabajo muestran que el genotipo ST213 se aísla frecuentemente de América del Norte y recientemente se ha extendido a Europa, Asia y Oceanía, por la cual puede representar un problema de salud pública mundial. El análisis aquí realizado incluyó la identificación genómica de determinantes de resistencia a antibióticos y virulencia, presentes tanto en el cromosoma bacteriano como en plásmidos. Con base en la

región de procedencia, el tipo de muestra de la cual se aislaron y el año de aislamiento de las cepas cuyos genomas se analizaron, se evaluaron también los patrones de dispersión y la posible datación de la aparición de dicho genotipo emergente en México y en el mundo. El patrón de agrupamiento generado por la presencia/ausencia de genes de resistencia a antibióticos y genes de virulencia en los genomas de estudio separa a las cepas del genotipo fundador ST19 y genotipo ST213, evidencia que sugiere ambientes de presión selectiva diferentes entre ambos genotipos. Los resultados del análisis filogenético son congruentes con esta hipótesis. La filogenia datada obtenida sugiere una separación entre ambos genotipos en el año 1949, y que la diversificación dentro del genotipo ST213 inició en la última década del siglo pasado. La filogenia datada, las redes de dispersión y el agrupamiento por genoma accesorio indican que el genotipo ST213 es capaz de vivir fuera del hospedero en una mayor diversidad de ambientes, o bien de colonizar distintos hospederos, estableciendo una dispersión eficiente entre hospederos y el ambiente. Dichas observaciones coinciden con estudios que muestran la presencia de genes de resistencia a antibióticos distintos entre distintos hospederos animales (Zalewska et al., 2021) y con los estudios que muestran que las cadenas de dispersión de cepas de *S. enterica* con diferencias en los genes de resistencia a antibióticos presentan patrones específicos de una región geográfica (Carroll et al., 2017). Así, como se ha enfatizado previamente, la descripción de cadenas de transmisión particulares en México tiene relevancia epidemiológica y de salud pública, ya que posibilita el diseño estrategias de prevención para evitar la dispersión de genotipos particulares que portan genes de resistencia a antibióticos específicos. Se ha documentado que en el serotipo Typhimurium la transmisión de multi-resistencia a antibióticos se incrementa en granjas de pollo de engorda que se han tratado con tetraciclina (Bauer-Garland et al., 2006). Dada la prevalencia del genotipo ST213 en la cadena de alimentos y su dispersión por esta vía aquí documentada, es importante evaluar estrategias de control distintas a las de dispersión entre seres humanos, como ocurre con el genotipo ST19. En ese sentido se han utilizado distintas alternativas al uso de antibióticos tradicionales con el objetivo de controlar la resistencia, entre las que se incluyen el uso de compuestos a base de clorato y nitro, así como el empleo de probióticos, prebióticos y simbióticos (Gebreyes et al., 2017). Inclusive, se ha evaluado la aplicación de productos fitoquímicos, a base de alcaloides vegetales. Cada una de dichas estrategias plantea ventajas

y desventajas, pero desafortunadamente ninguna ha demostrado ser un reemplazo eficaz al uso de antibióticos.

Para la generación de filogenias datadas fue necesario reconstruir el pangenoma de las cepas del genotipo ST213, algo que no se discutió en los capítulos de este trabajo en detalle debido a lo extenso de los resultados generados. En el presente trabajo se encontró que el pangenoma global de las cepas del genotipo ST213 es de 10.34 Mpb, lo que representa aproximadamente el 40% del pangenoma de *S. enterica* calculado previamente (Laing et al., 2017). El genoma núcleo global de este genotipo presentó un tamaño de 4.02 Mpb, que incluyó un total de 10 343 genes. Este tamaño y número de genes es significativamente mayor al del genoma núcleo calculado para el serotipo Typhimurium en distintos estudios. Así, se han reportado genomas núcleos con 3,836 (Fu et al., 2017), 3 846 (Fu et al., 2015), 3 910 (Hayden et al., 2016), 3 890 (Mather et al., 2016) y 4 209 (Yuan et al., 2022) genes. Es evidente el incremento en el tamaño del genoma núcleo entre cepas del mismo genotipo con relación al serotipo, debido a la relación cercana de las cepas comparadas. Son pocas las comparaciones que se pueden realizar con cepas del mismo genotipo dentro de *S. Typhimurium* ya que los estudios al respecto son escasos. El genoma núcleo de 10 cepas del genotipo ST313 está constituido de 4 112 genes (Seribelli et al., 2020), un valor significativamente menor al obtenido para el genotipo ST213. Todo lo anterior muestra la relevancia de obtener pangenomas y sus componentes a niveles más sutiles que los del serotipo para la realización de inferencias epidemiológicas robustas. Los datos preliminares muestran que el genoma núcleo puede variar considerablemente entre distintos genotipos del serotipo Typhimurium, las causas ecológicas y los mecanismos moleculares asociados a dichas diferencias están por determinarse.

Tanto las filogenias datadas como los patrones de agrupación presencia/ausencia de plásmidos, genes de resistencia a antibióticos y virulencia indican que ST213 llegó al Reino Unido desde EE. UU. y, desde este país, se extendió al resto de Europa, Asia y Oceanía. Es plausible que este patrón de dispersión desde Norteamérica hacia el Reino Unido y, desde allí, al resto de Europa, Asia y Oceanía se haya originado a través de viajeros intercontinentales. Es decir, el dispersor fue un humano y no un alimento. La gran gama de genes de virulencia encontrados en los genomas de las cepas ST19 y ST213 es congruente con la amplia documentación del repertorio de genes de virulencia de cepas del serotipo

Typhimurium en todo el mundo (Fàbrega y Vila, 2013; Dos Santos et al., 2019). En general, las cepas del genotipo ST213 tienen una mayor cantidad y diversidad de genes de resistencia a antibióticos que las cepas del genotipo ST19. Además, las cepas del genotipo ST213 poseen determinantes genéticos de resistencia a antibióticos que no se encuentra en ninguna de las cepas del genotipo ST19. Como se indicó previamente, el patrón de distribución de genes de virulencia distingue prácticamente de la misma forma que la filogenia datada entre las cepas de Norteamérica de las cepas europeas y asiáticas. La filogenia datada obtenida para las cepas globales del genotipo ST213 muestra una clara separación en dos clados, uno de Norteamérica y otro Euroasiático, con una fecha estimada del ancestro común más reciente (MRCA) de dichos clados en 1873, que sería el año estimado para el surgimiento del genotipo. El rango de años de la aparición del MRCA en el que cae el 95% de la más alta densidad de probabilidad (HPD) es entre 1815 y 1927, un rango de 112 años, siendo uno de los trabajos que establece una de las dataciones más antiguas de surgimiento de linajes dentro de *S. Typhimurium*. De manera interesante, aunque el surgimiento reciente del genotipo ST213 se reporta en México, los resultados muestran que el Clado Euroasiático del genotipo ST213 emergió primero, aproximadamente en 1908.

Con relación a los procesos de dispersión del genotipo ST213 por tipo de muestra, las cadenas de transmisión aquí elaboradas reafirman el papel relevante en salud pública de la contaminación humano-alimento-humano de *S. enterica* en general, y del serotipo Typhimurium en particular (Antunes et al., 2020; Pires et al., 2021). Finalmente, es importante recordar que debido a que se utilizó una aproximación genómica comparativa, el estudio realizado estuvo restringido por la disponibilidad de los genomas de los genotipos de estudio en las bases de datos públicas, así como los genomas generados en este trabajo. Es decir, los resultados generados no corresponden a un muestreo dirigido. Se analizaron todos los genomas del genotipo ST213 disponibles en bases de datos públicas, de buena calidad y con metadatos adecuados. Así, las tendencias y tasas de prevalencia aquí reportadas son el resultado de varios factores, incluido el estudio de brotes específicos por país, así como la capacidad de secuenciación genómica y su uso como herramienta de vigilancia epidemiológica en diferentes países.

Referencias bibliográficas

- Antunes, P., Novais, C., Peixe, L. (2020). Food-to-humans bacterial transmission. *Microbiology Spectrum*. 8(1): 8-1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-201>.
- Bauer-Garland, J., Frye, J. G., Gray, J. T., Berrang, M. E., Harrison, M. A., Fedorka-Cray, P. J. (2006). Transmission of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in poultry with and without antimicrobial selective pressure. *Journal of Applied Microbiology*. 101(6): 1301–1308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03036.x>.
- Besser, J. M. (2018). *Salmonella* epidemiology: a whirlwind of change. *Food Microbiology*. 71: 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>.
- Brown, E. W., Bell, R., Zhang, G., Timme, R., Zheng, J., Hammack, T. S., Allard, M. W. (2021). *Salmonella* genomics in public health and food safety. *EcoSal Plus*. 9(2): eESP-0008. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2020>.
- Carroll, L. M., Wiedmann, M., den Bakker, H., Siler, J., Warchocki, S., Kent, D., Lyalina, S., Davis, M., Sisco, W., Besser, T., Warnick, L. D., Pereira, R. V. (2017). Whole-genome sequencing of drug-resistant *Salmonella enterica* isolates from dairy cattle and humans in New York and Washington states reveals source and geographic associations. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(12): e00140-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00140-17>.
- Dos Santos, A. M., Ferrari, R. G., Conte-Junior, C. A. (2019). Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*. 76: 762–773. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1510-4>.
- Fàbrega, A., Vila, J. (2013). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical Microbiology Reviews*. 26(2), 308–341. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>.
- Fu, S., Octavia, S., Tanaka, M. M., Sintchenko, V., Lan, R. (2015). Defining the core genome of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for genomic surveillance and epidemiological typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 53: 2530–2538. <https://doi.org/10.1128/JCM.03407-14>.
- Fu, S., Hiley, L., Octavia, S., Tanaka, M. M., Sintchenko, V., Lan, R. (2017). Comparative genomics of Australian and international isolates of *Salmonella* Typhimurium: correlation of core genome evolution with CRISPR and prophage profiles. *Scientific Reports*. 7(1): 9733. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06079-1>.
- Gebreyes, W. A., Wittum, T., Habing, G., Alali, W., Usui, M., Suzuki, S. (2017). Spread of antibiotic resistance in food animal production systems. In C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, H. P. Riemann (Edits.) *Foodborne Diseases, 3rd Edition*. Oxford, United Kingdom, Academic Press. pp. 105–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00004-8>.
- Hayden, H. S., Matamouros, S., Hager, K. R., Brittnacher, M. J., Rohmer, L., Radey, M. C., Weiss, E. J., Kim, K. B., Jacobs, M. A., Sims-Day, E. H., Yue, M., Zaidi, M. B., Schifferli, D. M., Manning, S. D., Walson, J. L., Miller, S. I. (2016). Genomic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium characterizes strain diversity for recent U.S. salmonellosis cases and identifies mutations linked to loss of fitness under nitrosative and oxidative stress. *MBio*. 7: e00154. <https://doi.org/10.1128/mBio.00154-16>.

- Kingsley, R. A., Msefula, C. L., Thomson, N. R., Kariuki, S., Holt, K. E., Gordon, M. A., Harris, D., Clarke, L., Whitehead, S., Sangal, V., Marsh, K., Achtman, M., Molyneux, M. E., Cormican, M., Parkhill, J., MacLennan, C. A., Heyderman, R. S., Dougan, G. (2009). Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. *Genome Research*. 19(12), 2279–2287. <https://doi.org/10.1101/gr.091017.109>.
- Laing, C. R., Whiteside, M. D., Gannon, V. P. (2017). Pan-genome analyses of the species *Salmonella enterica*, and identification of genomic markers predictive for species, subspecies, and serovar. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01345>.
- Mather, A. E., Lawson, B., de Pinna, E., Wigley, P., Parkhill, J., Thomson, N. R., Page, A. J., Holmes, M. A., Paterson, G. K. (2016). Genomic Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from wild passerines in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 6728–6735. <https://doi.org/10.1128/AEM.01660-16>.
- Mather, A. E., Phuong, T. L. T., Gao, Y., Clare, S., Mukhopadhyay, S., Goulding, D. A., Hoang, N. T. D., Tuyen, H. T., Lan, N. P. H., Thompson, C. N., Trang, N. H. T., Carrique-Mas, J., Tue, N. T., Campbell, J. I., Rabaa, M. A., Thanh, D. P., Harcourt, K., Hoa, N. T., Trung, N. V., Schultsz, C., ... Baker, S. (2018). New variant of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium associated with invasive disease in immunocompromised patients in Vietnam. *MBio*. 9(5): e01056-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01056-18>.
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Connor, T. R., Harris, S. R., Parry, C. M., Al-Mashhadani, M. N., Kariuki, S., Msefula, C. L., Gordon, M. A., de Pinna, E., Wain, J., Heyderman, R. S., Obaro, S., Alonso, P. L., Mandomando, I., MacLennan, C. A., Tapia, M. D., Levine, M. M., Tennant, S. M., Parkhill, J., ... Dougan, G. (2012). Intracontinental spread of human invasive *Salmonella* Typhimurium pathovariants in sub-Saharan Africa. *Nature genetics*. 44(11), 1215–1221. <https://doi.org/10.1038/ng.2423>.
- Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., Gobena, T., Majowicz, S. E., Hald, T., Hoejskov, P. S., Minato, Y., Devleesschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: Think global, act local. *Current Opinion in Food Science*. 39: 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>.
- Seribelli, A. A., Gonzales, J. C., de Almeida, F., Benevides, L., Cazentini Medeiros, M. I., dos Prazeres-Rodrigues, D., de C Soares, S., Allard, M. W., Falcão, J. P. (2020). Phylogenetic analysis revealed that *Salmonella* Typhimurium ST313 isolated from humans and food in Brazil presented a high genomic similarity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 51: 53–64. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00155-6>.
- Sun, J., Ke, B., Huang, Y., He, D., Li, X., Liang, Z., Ke, C. (2014). The molecular epidemiological characteristics and genetic diversity of *Salmonella* typhimurium in Guangdong, China, 2007–2011. *PloS One*. 9(11), e113145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113145>.
- Wattiau, P., Boland, C., Bertrand, S. (2011). Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(22): 7877–7885. <https://doi.org/10.1128/AEM.05527-11>.

- Wiesner, M., Zaidi, M. B., Calva, E., Fernández-Mora, M., Calva, J. J., Silva, C. (2009). Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiology*. 9(1): 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-131>.
- Yuan, Y., Seif, Y., Rychel, K., Yoo, R., Chauhan, S., Poudel, S., Al-Bulushi, T., Palsson, B. O., Sastry, A. V. (2022). Pan-genome analysis of transcriptional regulation in six *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains reveals their different regulatory structures. *Msystems*. 7(6): e00467-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00467-22>.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., Popowska, M. (2021). Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure—consequences of its application in agriculture. *Frontiers in Microbiology*. 12: 640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.610656>.

VIII. CONCLUSIÓN

Salmonella enterica constituye un problema de salud pública mundial, particularmente el serotipo Typhimurium, siendo la Secuencia Tipo 19 (ST19) la más ampliamente distribuida mundialmente. En México se ha reportado el genotipo ST213 como emergente asociado a un proceso de desplazamiento del genotipo fundador ST19; sin embargo, son pocos los estudios al respecto, este trabajo es el primero en realizar un análisis comparativo para evaluar las diferencias genómico-epidemiológicas entre cepas de los genotipos ST19 y ST213 de *S. enterica* serotipo Typhimurium de México y entre cepas del genotipo ST213 de diferentes regiones del mundo. Los resultados obtenidos sugieren ambientes de presión selectiva diferentes entre los genotipos ST19 y ST213, así como la separación entre ambos genotipos en el año 1949. La información obtenida indica que el genotipo ST213 es capaz de establecer una eficiente dispersión entre hospederos y el ambiente. Además, se indica que el genotipo ST213 llegó al Reino Unido desde EE. UU. y, desde este país, se extendió al resto de Europa, Asia y Oceanía, siendo el dispersor un humano y no un alimento, lo cual reafirma el papel relevante en salud pública de la contaminación humano-alimento-humano de *S. Typhimurium*. Dentro del genotipo ST213 se muestra una clara separación en dos clados, uno de Norteamérica y otro Euroasiático, con una fecha estimada del MRCA en 1873, que sería el año estimado para el surgimiento del genotipo. De manera interesante, los resultados muestran que el Clado Euroasiático del genotipo ST213 emergió primero, aun cuando el surgimiento reciente del genotipo ST213 se registró en México. Finalmente, es importante recordar que el estudio realizado estuvo restringido por la disponibilidad de los genomas de los genotipos de estudio en las bases de datos públicas, así como los genomas generados en este trabajo. Es decir, los resultados generados no corresponden a un muestreo dirigido.

sabermás

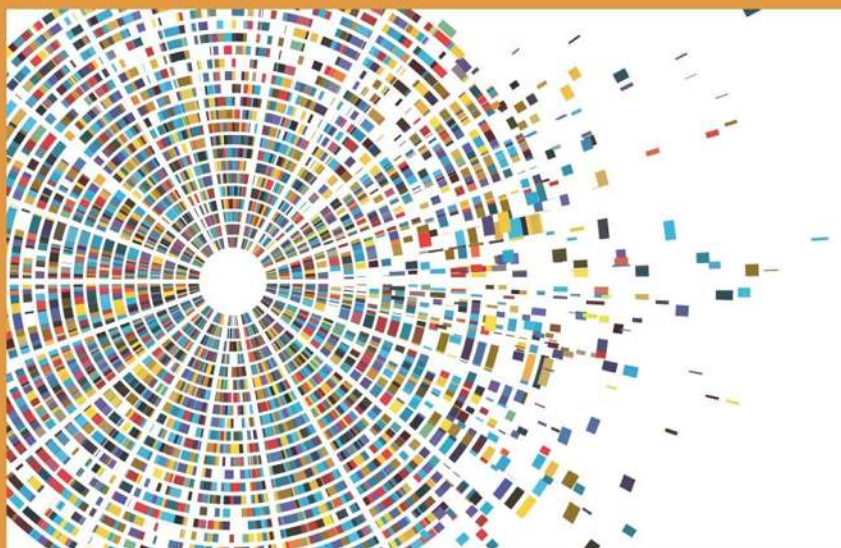
Revista de Divulgación
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Año 11 / No. 66 noviembre - diciembre / 2022
Morelia, Michoacán, México
U.M.S.N.H.



UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores
ISSN-2007-7041

CONTENIDO



Diagnóstico de enfermedades bacterianas: Evolución de técnicas

36

ARTÍCULOS	Plantas geófitas de México con potencial ornamental	15
	Las flores en mi florero	19
	La resistencia a antimicrobianos no es exclusiva de las bacterias	23
	<i>Xurahue Muyeca</i> : Reservorio biológico y cultural	26
	MiniBeBe: El detector mexicano de partículas	31
	Insectos: Sus beneficios aún sin explorar	44
	Simbiosis insecto-bacteria ante el cambio climático	48
	Los piojos harinosos, la excepción a la regla	53
	El poder de los frutos rojos	57
	Retorno de conquistadores: Crónicas de extintos caballos mexicanos del Pleistoceno	62
La música y su efecto en las plantas	66	



ENTÉRATE

Misión Artemis I: Prepara la NASA el regreso del hombre a la luna

6

TECNOLOGÍA

¿Qué son los Biosensores?

71

UNA PROBADA DE CIENCIA

Imparables

75

CIENCIA EN POCAS PALABRAS

Fertilización orgánica y sostenibilidad agroalimentaria

79

LA CIENCIA EN EL CINE

El gabinete de las curiosidades

84

NATUGRAFÍA

Zurcidora de Mosaico

88

INFOGRAFÍA

Hablemos de los antimicrobianos

89



Entrevista al Dr. Axel Becerra Santacruz

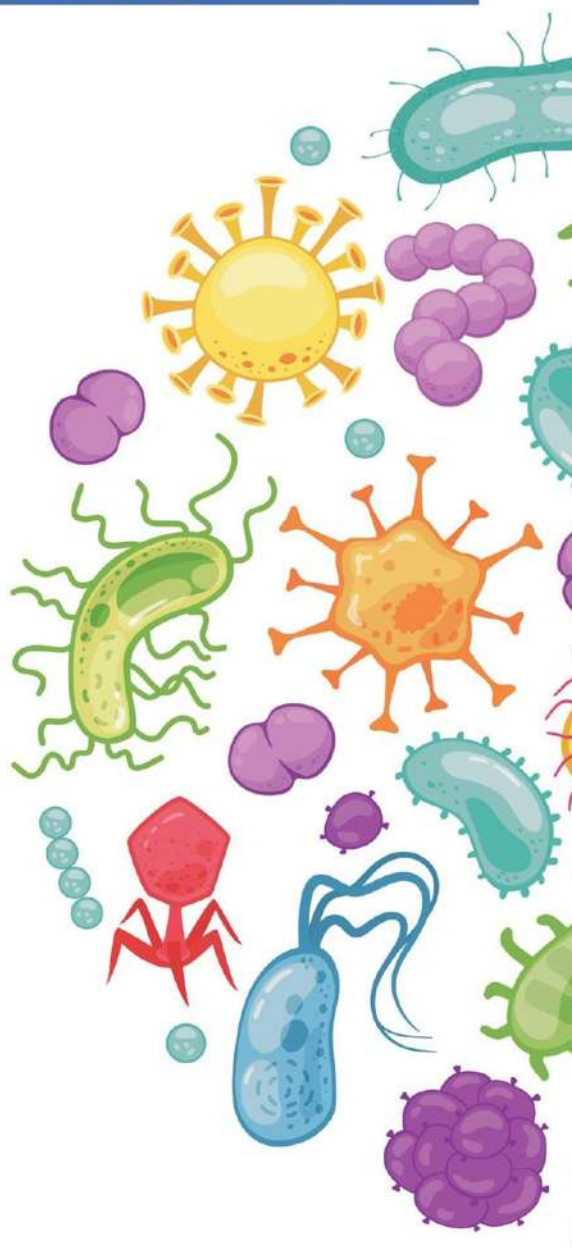
Director y Profesor Investigador Titular en la Facultad de Arquitectura

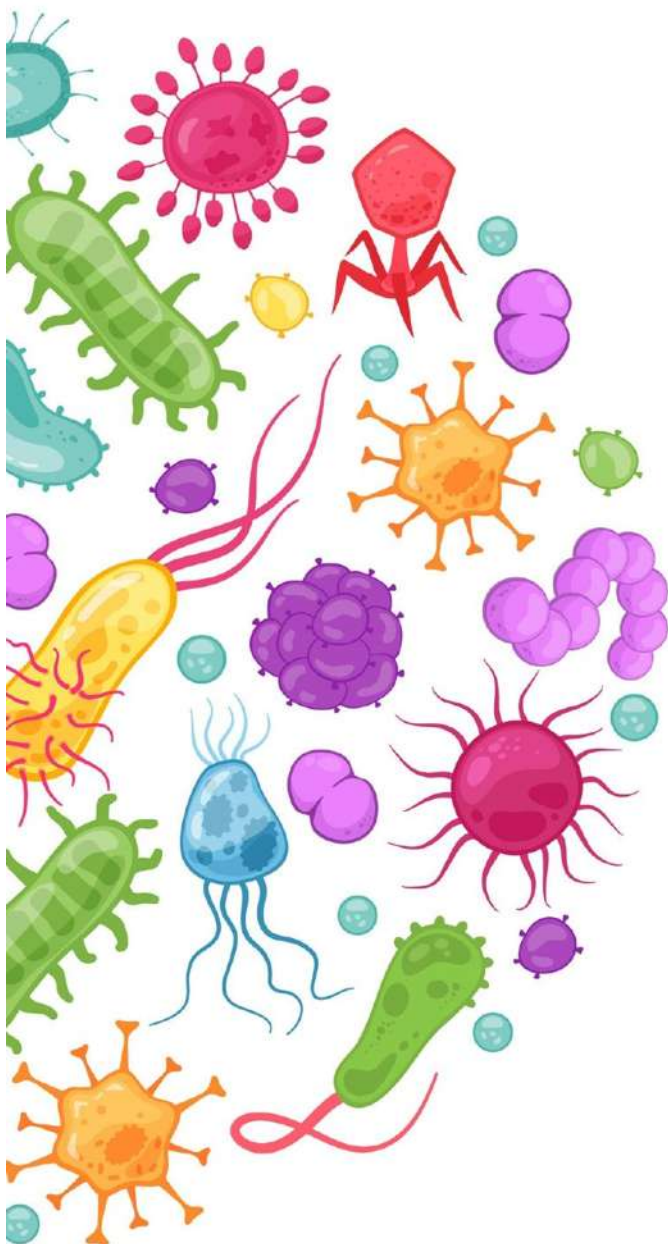
9

ARTÍCULO DE PORTADA

Diagnóstico de enfermedades bacterianas: Evolución de técnicas

Elda Araceli Hernández Díaz y Gerardo Vázquez-Marrufo





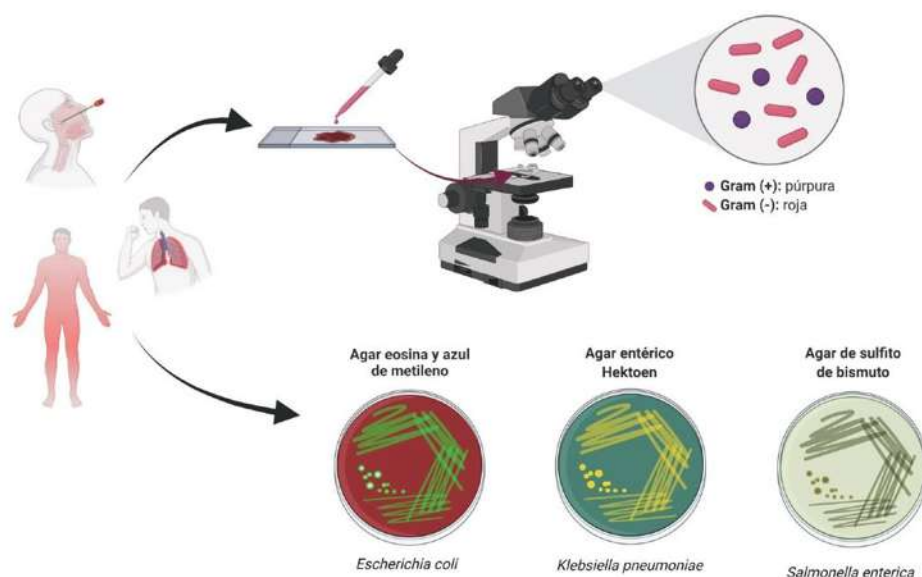
En estudios de salud pública y epidemiología relacionados con enfermedades causadas por los virus y las bacterias, es importante contar con **herramientas de laboratorio** que permitan la **identificación de la especie del agente patógeno** responsable de la enfermedad. La detección e identificación de la especie bacteriana causante de una enfermedad, junto con otro tipo de evidencia colectada por el personal de salud que atiende a un paciente, como los síntomas que este presenta, permite obtener un **diagnóstico correcto**.

El diagnóstico acertado de una enfermedad infecciosa permite iniciar el tratamiento adecuado del paciente y la toma de decisiones para prevenir la dispersión de la enfermedad entre la población. En este artículo te presentamos un panorama general de cómo han progresado las técnicas de laboratorio de microbiología utilizadas para detectar e identificar las bacterias patógenas del ser humano.

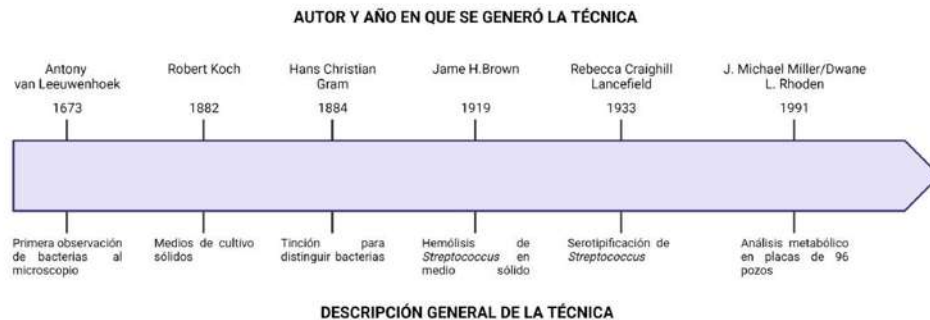
El microscopio y el cultivo, las bases para la identificación bacteriana

Un grupo de herramientas de laboratorio empleadas en la identificación de una especie bacteriana se basan en el estudio de las características fenotípicas, con el que se analizan aspectos microscópicos morfológicos del patógeno, o bien propiedades bioquímicas como la capacidad para crecer en medios de cultivo que contienen nutrientes particulares. La incorporación del **microscopio** para la observación directa de bacterias en muestras obtenidas del paciente proveniente de piel, sangre y cabello o de secreciones como saliva y orina, fue la **primera herramienta del laboratorio de microbiología** para la detección de bacterias patógenas.

La primera observación de una bacteria al microscopio la hizo el holandés Antony van Leeuwenhoek en 1673, que junto con la observación de hongos por el inglés Robert Hooke en 1665, marcan los inicios de la **microbiología como cien-**



Entre las primeras herramientas empleadas para la identificación de bacterias patógenas y el diagnóstico de enfermedades causadas por estas, se encuentran el análisis microscópico de muestras clínicas tomadas al paciente y la tinción con colorantes específicos, como el caso de la tinción de Gram, así como el cultivo bacteriano en medios selectivos. Imagen elaborada con Biorender.com.



Línea de tiempo del surgimiento de algunas de las herramientas de diagnóstico fenotípico relevantes. El tiempo no está en escala. Imagen elaborada con Biorender.com.

cia moderna. El microscopio permitió el reconocimiento de distintas especies microbianas con base en la forma de sus células y sus estructuras de movilidad y adhesión asociadas, como fimbrias y flagelos, iniciando así la clasificación bacteriana para distinguir entre especies.

La observación de las bacterias directamente en las muestras clínicas de humanos, **se optimizó empleando tratamientos químicos** que generaban distintos tipos de coloración, permitiendo así contrastar mejor a la bacteria en el tejido e identificar grupos de bacterias específicas. Entre los ensayos de tinción de bacterias para su observación al microscopio, destaca la denominada tinción de Gram, desarrollada por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram en 1884, para observar bacterias en tejido pulmonar de pacientes que habían muerto a causa de neumonía.

Dicha tinción revela diferencias en la estructura de la pared celular de las bacterias. Este ensayo dividió a las **bacterias en dos grandes grupos**, las que respondían al tratamiento químico y se podían observar teñidas al microscopio con una coloración azul-violeta, denominadas Gram-positivas, y las que no respondían al tratamiento presentando una coloración roja, denominadas Gram-negativas. A la fecha, **esta clasificación se sigue empleando** como criterio inicial de diagnóstico en enfermedades infecciosas. A partir del uso del microscopio, la identificación de bacterias patógenas avanzó de la mano de la determinación

de especies para su clasificación biológica a nivel general.

Una herramienta de diagnóstico de laboratorio posterior al uso del microscopio fue el **aislamiento de la bacteria** procedente de los tejidos y fluidos del individuo enfermo, y su **crecimiento en medios de cultivo adecuados**. Aunque no existe un consenso, se atribuye al inglés Joseph Lister el primer cultivo puro de una bacteria entre 1877-1878, al realizar diluciones de leche para aislar a la bacteria responsable de la producción de ácido láctico y el cuajo de la leche. Microbiólogos como el francés Louis Pasteur ya habían elaborado medios de cultivo líquidos; pero es en el laboratorio del alemán Robert Koch en donde se prepara, entre 1881 y 1882, el medio de cultivo sólido para obtener cultivos puros de bacterias. El medio de cultivo se desarrolla gracias a Fanny Eilshemius, quien le sugirió a su esposo Walther Hesse, colaborador de Koch, la inclusión del agar en la formulación. En la actualidad **existe una gran variedad de medios de cultivo específicos**, que permite distinguir fácilmente a distintas bacterias patógenas mediante cambios de color y formas de crecimiento, entre otras características.

Pruebas bioquímicas y metabólicas en la identificación de bacterias infecciosas

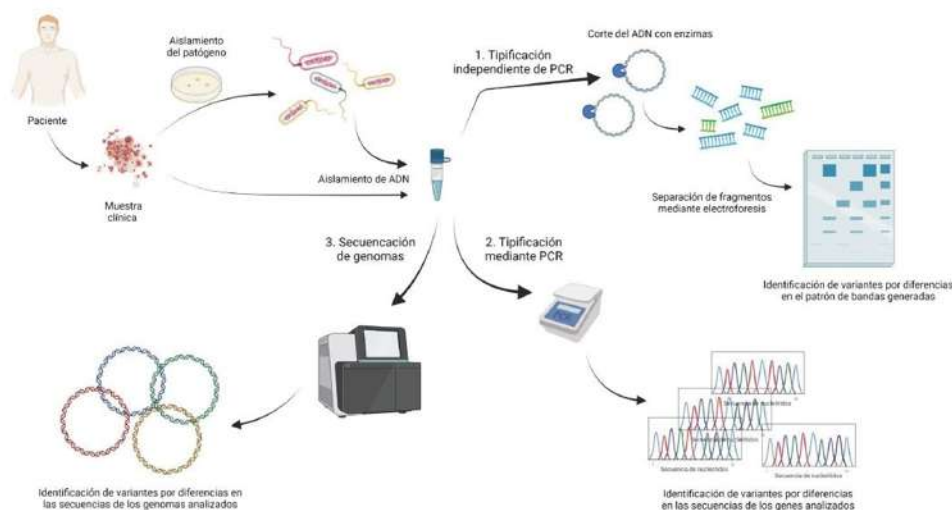
Una vez que se pudo realizar el cultivo puro de bacterias patógenas, se conocieron sus diferencias en la capacidad para producir sustancias

químicas y para emplear enzimas que les permitían utilizar o procesar distintos tipos de compuestos químicos adicionados al medio. Así se marcó un tercer paso relevante en el diagnóstico microbiológico, la **identificación de moléculas y enzimas**, característicos de cada especie bacteriana. Por ejemplo, se encontró que algunas **bacterias** eran **capaces de destruir glóbulos rojos** en un medio de cultivo al que se le había añadido sangre, creando un cambio de color en el medio. Al proceso de destrucción de los glóbulos rojos se le denominó **hemólisis** y la observación permitió diseñar un medio de cultivo para el diagnóstico de este tipo de bacterias.

Aunque no se tiene la certeza sobre quién diseñó el medio de cultivo con sangre, los estudios de James H. Brown sobre la capacidad hemolítica de bacterias del género *Streptococcus* realizados entre 1915 y 1919, figuran entre los primeros que usan esta herramienta de cultivo para clasificar bacterias patógenas. La **capacidad de metabolizar distintos azúcares** para la producción de alcohol, denominada **fermentación**, fue también incorporada como prueba diagnóstica dentro de este grupo de herramientas.

Una derivación técnica relativamente reciente, originada de la capacidad de cultivo bacteriano y de las diferencias en las capacidades bioquímicas y metabólicas de las distintas especies, fue la **sustitución del medio de cultivo sólido en placas de Petri por placas de plástico con 96 pozos**, que contienen cada uno distintas moléculas orgánicas como carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos, entre otros. La bacteria de interés aislada del paciente se inocula en cada uno de los pozos en medio líquido y se determina su capacidad para metabolizar y crecer en presencia de cada una de las moléculas de prueba en los pozos de la placa. Esta técnica, propuesta en 1991 por los estadounidenses J. Michael Miller y Dwane L. Rhoden para la identificación de bacterias patógenas, permitió la evaluación de múltiples condiciones de cultivo en un solo ensayo, así como la posterior lectura automática mediante un equipo de cómputo de los resultados.

En la segunda mitad del siglo pasado se incorporó la **espectrometría de masas** para la **identificación de biomoléculas** presentes en las células bacterias. En 1973, Henk L. C. Meuzelaar y Piet G. Kistemaker, observaron por primera vez patro-



Ejemplos de tres técnicas de tipificación genético molecular de bacterias patógenas. Algunas se basan en el ensayo de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y otras no. La herramienta más actual en este grupo es la secuenciación de genomas completos. Imagen elaborada con Biorender.com.



Línea de tiempo del surgimiento de algunas de las herramientas de diagnóstico genético molecular relevantes. El tiempo no está en escala. Imagen elaborada con Biorender.com.

nes específicos de señales de moléculas orgánicas ionizadas producidas por el calentamiento de bacterias de los géneros *Neisseria* y *Leptospira*. Dos años más tarde, John P. Anhalt y Catherine Clarke Fenselau, propusieron la espectrometría de masas como herramienta para la **identificación bacteriana**. La espectrometría de masas experimentó un rápido desarrollo en décadas posteriores y, actualmente, es capaz de analizar moléculas como proteínas, ADN y lípidos, que son ionizadas mediante técnicas especiales aun en las células intactas, detectando patrones específicos inclusive entre cepas distintas de la misma especie bacteriana, lo que la hizo una herramienta eficaz en el diagnóstico microbiológico.

El sistema inmune ayudó en la identificación de bacterias patógenas

Con los estudios del sistema inmune en seres humanos y distintos animales de laboratorio, como ratones y conejos, se conoció un tipo de proteínas muy particular denominadas **anticuerpos**, que se producen para **identificar agentes extraños dentro del cuerpo**, llamados genéricamente antígenos. Los anticuerpos reconocen y se unen a moléculas de la superficie de las bacterias, como azúcares, lípidos y proteínas, que permiten su identificación como agentes extraños al cuerpo y su posterior destrucción por el sistema inmune. Este conocimiento permitió el nacimiento de una nueva herramienta en el diagnóstico de enfermedades bacterianas, la **serotipificación**.

El trabajo pionero de la estadounidense Rebecca Craighill Lancefield, quien estudió las moléculas antigénicas del género *Streptococcus* entre 1920 y 1933, le permitió su división en distintos

serotipos o serogrupos, diferenciando los prevalentes y más virulentos en humanos, de los que se aislaban de animales. Se crea así un grupo de sueros con distintos anticuerpos que sirven para identificar diferentes componentes químicos de la superficie de un patógeno particular. En esta técnica **se utilizan anticuerpos** dirigidos contra distintas especies o variantes de una misma especie bacteriana, estrategia denominada de manera general como **subtipificación**.

La subtipificación bacteriana fue un evento relevante en epidemiología y salud pública en general, ya que permitió distinguir aquellas variantes que causan una enfermedad más grave de aquellas que presentan solo síntomas leves de la enfermedad, o que entran al cuerpo sin ser detectadas por la falta de síntomas detectables por los médicos. A la fecha, existen diversas variantes de identificación de bacterias patógenas basadas en la aplicación de anticuerpos, denominadas genéricamente **inmunoensayos**. Un ensayo común es el ELISA, derivado de sus siglas en inglés, *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

El diagnóstico y la identificación genético-molecular

A partir de las últimas dos décadas del siglo pasado, se inició la detección e identificación bacteriana mediante el análisis de su material genético o ácido desoxirribonucleico (ADN), naciendo así las denominadas **técnicas de identificación y tipificación genético-molecular**. Desde entonces, a la fecha, se han diseñado y abandonado un gran número de este tipo de técnicas por diferentes grupos de investigación en el mundo, que por

razones de espacio sería imposible mencionarlas en este artículo, pero te describimos las principales.

Durante este periodo se han abordado distintas clasificaciones de las técnicas genético-moleculares de tipificación. Por ejemplo, podían dividirse en dos grupos, de acuerdo con las características generales de la metodología empleada, diferenciándose en aquellas basadas en «patrones de bandeo» del ADN y las basadas en secuencias de ADN. El término «patrones de bandeo» se refiere a que las diferencias entre las bacterias analizadas se establecen con base en fragmentos de ADN de distinto tamaño molecular que se pueden visualizar mediante métodos de rutina en un laboratorio de biología molecular. La técnica de patrones de bandeo que ha sido considerada un estándar de oro para la y subtipificación bacteriana, es la **Electroforesis en Geles de Campo Pulsado** (*Pulse Field Gel Electrophoresis*, PFGE), introducida por David C. Schwartz y Charles R. Cantor en 1984.

Otra clasificación de las técnicas de identificación genético molecular, distingue entre aquellas basadas en la **Reacción en Cadena de la Polimerasa** (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) y las no basadas en esta herramienta. La técnica de PCR fue descrita por Kary Mullis y sus colegas en 1986. Quizá **en los últimos meses has oído hablar bastante de esta técnica** por su relevancia para el diagnóstico de COVID-19 para detectar al virus SARS-CoV-2, y debido a la gran cantidad de información que se ha generado al respecto (no abordaremos en detalle su fundamento y aplicación).

En el análisis de secuencias de ADN para la tipificación bacteriana, se utilizaron inicialmente uno o dos genes para identificar a la especie de interés. Posteriormente, un equipo de científicos coordinados por Martin C. J. Maiden incorporó en 1988 el análisis de la secuencia de siete genes, en una técnica a la que se designó por sus siglas en inglés como MLST (*Multi Locus Sequence Typing*). Por sus características, esta técnica permitió el análisis de poblaciones de bacterias de la misma especie, distinguiendo de una manera muy precisa aquellas bacterias relacionadas con brotes de infecciones en una población o grupo de individuos, con las bacterias de la misma especie que se

encontraban presentes en el área del brote, pero que no tenían relación con este.

Lo que en la actualidad se considera la herramienta más poderosa de identificación y tipificación para el diagnóstico surgida en los últimos años, ha sido sin duda alguna la obtención y el análisis de la **Secuencia de Nucleótidos del Genoma** completo de las bacterias (por sus siglas en inglés *Whole Genome Sequencing*, WGS). Esto ha sido posible debido al **desarrollo de técnicas de secuenciación masiva** que permiten la obtención de millones de datos sobre la secuencia de un genoma, tan solo en unas horas o pocos días, dependiendo de la técnica de secuenciación empleada y del tamaño del genoma analizado.

Debido a que las técnicas de secuenciación masiva generan fragmentos pequeños de ADN, se requiere de **herramientas de cómputo para «ensamblar» el genoma en el orden correcto**. Para que puedas darte una idea de este proceso, piensa en un rompecabezas de un gran número de piezas que quieras ensamblar para conocer la imagen completa. Las herramientas de cómputo para el ensamble y análisis de secuencias de genomas bacterianos completos, son toda un área de especialización denominada **Bioinformática**, que también se aplica para el análisis de otras moléculas biológicas complejas como proteínas, carbohidratos, lípidos y ácido ribonucleico (ARN), con algunas diferencias específicas para cada caso. Estas herramientas incluyen el diseño de programas informáticos o software especializado.

Herramientas de diagnóstico cada vez más simples

Aunque en la actualidad el diagnóstico y análisis epidemiológico mediante la comparación de genomas completos es una labor compleja y altamente especializada, cada año las herramientas para desarrollar dicha tarea se han ido simplificando y realizando mediante sitios de internet que facilitan el análisis y la interpretación de los datos. Es de esperar que en un futuro muy cercano tanto la obtención de genomas bacterianos como su análisis, sean accesibles en costo para todo el interesado y sin la necesidad de tener un gran conocimiento para el manejo de programas de computadora especializados.

La secuenciación de genomas completos para el diagnóstico y la tipificación bacteriana ya es una **técnica rutinaria y establecida como requisito en varios países del primer mundo** y que en el corto tiempo se extenderá a la mayoría de los países. Sin duda alguna la pandemia por COVID-19 por la que todavía estamos atravesando, ha mostrado la relevancia de la secuenciación de genomas de cualquier patógeno como la herramienta que llegó para quedarse por un largo tiempo en el laboratorio de diagnóstico microbiológico.

Otro avance significativo en las últimas décadas es el **desarrollo de kits de diagnóstico por-**

tátiles y de fácil manejo, de manera similar a las pruebas de glucosa y de embarazo, que hacen uso de algunos de los fundamentos mencionados anteriormente. Es cada vez más común la presencia de este tipo de pruebas de diagnóstico que se pueden adquirir en las farmacias y realizar el ensayo en casa. Este desarrollo también se ha acelerado en los dos últimos años como consecuencia de la pandemia de COVID-19. Por motivos de espacio, ya no se detallan dichas aplicaciones, pero el lector encontrará mucha información al respecto navegando en la red.



Elda Araceli Hernández Díaz. candidata a Doctora, Doctorado en Ciencias Biológicas en la Opción de Biotecnología Molecular, del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH. Realizó sus estudios de Licenciatura en la Facultad de Químico-farmacobiología-UMSNH y los estudios de Maestría en Ciencias de la Salud de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"-UMSNH. Su interés es en el análisis de virulencia y resistencia a antibióticos, tanto experimental como bioinformático, de bacterias patógenas de humano.

0617452B@umich.mx

Gerardo Vázquez-Marrugo. Realizó la licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo (QFB) en Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato y la Maestría en Ciencias en la misma institución. Obtuvo el Doctorado en Ciencias en la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato. Es Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores (SNI). Ha publicado 46 artículos en revistas internacionales con índice de impacto. Le interesa la epidemiología molecular de bacterias patógenas de humano y el estudio de hongos silvestres con potencial biotecnológico.

g.vazquez@umich.mx



Balsalobre-Arenas, L. y Alarcón-Cavero, T. (2017). Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(6), 367-376. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X17300228>

Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753-763. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001510>

Serrano, M.R.G., Escartín, N.L., Arriaza, M.M. y Díaz, J.C.R. (2019). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(5), 335-340. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X18300806>

Vila, J., Gómez, M.D., Salavert, M. y Bosch J. (2017). Métodos de diagnóstico rápido en microbiología clínica: necesidades clínicas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(1), 41-46. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X16303500>