



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS INSTITUTO
DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**EL PAPEL DE LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL EN LA
EVOLUCIÓN DE LA VIRULENCIA DEL GÉNERO *SERRATIA***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
LUISA BEATRIZ SANDNER MIRANDA

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DR. PABLO VINUESA FLEISCHMANN
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CDMX, AGOSTO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico; UNAM (DGAPA-UNAM PAPIIT) con los proyectos Papiit IN213816 y IN211814 y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Conacyt con proyectos 100343 y 179133.

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por la oportunidad brindada para la realización de mi posgrado.

Finalmente, agradezco a Gabriela Delgado por sus enriquecedoras discusiones, a José Luis Méndez por su valuable apoyo en los ensayos de laboratorio y a Luis Fernando Espinosa por su apoyo técnico.

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Origen de la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	4
3. Justificación	6
4. Objetivos	7
5. Materiales y Métodos	8
5.1. Secuenciación de la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836 en el genoma de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	8
5.2. Identificación de elementos móviles y genes de virulencia de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	9
5.3. Identificación de genes de resistencia a antibióticos en la cepa <i>S.</i> <i>marcescens</i> SmUNAM836	9
5.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	10
5.5. Análisis de genómica comparativa con los genomas completos de las cepas de <i>Serratia</i> spp. de la base de datos del GenBank con el fin de identificar los elementos asociados a transferencia horizontal	11
5.6. Relaciones filogenéticas del género <i>Serratia</i> y número de determinantes de resistencia	11
6. Resultados	12
6.1. Secuenciación de la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM833	12
6.2. Escrutinio de elementos móviles y genes de virulencia de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836.	13
6.2.1. Plásmido pSmUNAM836	13
6.2.2. Islas Genómicas identificadas en la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	14

6.2.3. Profagos identificados en la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	19
6.2.4. Genes de virulencia detectados en la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	23
7. Resistencia antimicrobiana	26
7.1. Identificación de los genes de resistencia a antimicrobianos en la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836 y su correlación con su perfil fenotípico de resistencia	26
7.2. Resistencia antimicrobiana en la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	27
7.2.1. Genes de resistencia intrínseca	27
7.2.2. Genes asociados a bombas de eflujo	29
7.2.3. Resistencia adquirida por HGT y mutaciones	33
8. Genómica comparativa de 32 cepas de <i>Serratia</i> spp. a la luz de la HGT	36
8.1. Genes de resistencia intrínseca y bombas de eflujo	40
8.2. Genes de resistencia adquirida	40
8.3. Frecuencia de genes de resistencia según la clase del antibiótico en el resistoma de <i>Serratia</i> spp.	41
9. Relaciones filogenéticas del género <i>Serratia</i> y número de determinantes de resistencia	43
10. Conclusión	45
11. Bibliografía	47
12. Artículo	63

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies y subespecies descritas actualmente del género <i>Serratia</i> , hábitat y patogenicidad reportada	1
Tabla 2. Lista de los 32 genomas de <i>Serratia</i> spp. analizados	12
Tabla 3. Características generales de las islas genómicas de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	22

Tabla 4. Características generales de los profagos de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM	23
Tabla 5. Factores de virulencia de la cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	25
Tabla 6. Perfil de resistencia a antimicrobianos y determinantes genéticos responsables de la resistencia de la cepa <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	27
Tabla 7. Bombas de eflujo identificadas en el genoma de <i>S. marcescens</i> SmUNAM836	32
Tablas Suplementarias 1S y 2S	62

Índice de Figuras

Figura 1. Imagen del microscopio bifocal donde se muestran dos colonias con diferentes morfologías creciendo estrechamente juntas	5
Figura 2. Alineamiento de los plásmidos pSmUNAM836 de <i>S. marcescens</i> y el plásmido pKPC-f91 de <i>Enterobacter cloacae</i>	14
Figura 3. Identificación de islas genómicas con el programa IslandViewer3	18
Figura 4. Identificación de profagos con el programa PHAST	21
Figura 5. Mutación en el codón Ser83 del gen de la topoisomerasa <i>gyrA</i>	35
Figura 6. Número de genes de resistencia intrínseca y adquirida identificados en los 32 genomas de <i>Serratia</i> spp.	38
Figura 7. Diagrama de caja que ilustra el número de genes asociados a bombas de eflujo de los 32 genomas de <i>Serratia</i> spp.	39
Figura 8. Diagrama de Venn que muestra el resistoma de <i>Serratia</i> spp. basado en el nicho	39
Figura 9. Frecuencia de genes de resistencia según la clase o familia de antimicrobianos en el resistoma de <i>Serratia</i> spp.	42
Figura 10. Diagrama de Venn del pangenoma de <i>Serratia</i> spp. generado por los algoritmos COG y OMCL	44
Figura 11. La figura muestra un árbol pangenómico de parsimonia de los 32 genomas de <i>Serratia</i> spp.	44

Resumen

- Los miembros del género *Serratia* son patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales. Cabe destacar su resistencia a una gran variedad de familias de antibióticos: β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas y antibióticos polipeptídicos. El objetivo de este estudio fue identificar los genes responsables de la resistencia intrínseca y adquirida (resistoma) en el género *Serratia*, así como los elementos de transferencia horizontal asociados con la virulencia de este género.
- La cepa de estudio *S. marcescens* SmUNAM836 presenta un plásmido, 13 islas genómicas y 5 profagos los cuales contienen diversos elementos de virulencia y de resistencia a antibióticos.
- Se realizaron análisis filogenómicos y de genómica comparativa utilizando 32 genomas de *Serratia* spp. depositados en el GenBank. El genoma completo de todas las cepas se analizó utilizando las bases de datos BLASTN, CARD y ResFinder para identificar genes de resistencia a antibióticos (GRA) y genes de virulencia. Se generó una filogenia de parsimonia con base al pangenoma de los 32 genomas de *Serratia* spp. derivados de la presencia/ausencia de genes homólogos.
- Se reportó un resistoma para *Serratia* spp. de 123 genes de resistencia a antibióticos: 107 genes de resistencia intrínseca (33 GRA intrínsecos y 74 genes asociados a bombas de eflujo) y 16 GRA adquiridos (13 en plásmidos, 2 en transposones y la mutación del gen *gyrA*). La mayoría de los GRA son cromosómicos y pocos se encuentran en elementos móviles. Las cepas patogénicas y ambientales presentaron un mayor número de GRA intrínsecos, especialmente genes que codifican para sistemas de eflujo, que las cepas simbióticas. Los patógenos nosocomiales presentaron un mayor número de GRA adquiridos que los aislamientos ambientales. De los 123 GRA, 80 están presentes en una o más cepas de cada nicho, 7 son compartidos por patógenos y cepas ambientales, 2 son compartidos por patógenos y cepas simbióticas, y uno es compartido por cepas ambientales y simbióticas. 18 GRA fueron exclusivamente de patógenos, 14 de cepas ambientales y uno de una cepa simbiótica. El árbol pangenómico de parsimonia muestra cinco clados principales congruentes con la filogenia de *Serratia* spp.
- Las infecciones producidas por *Serratia* spp. plantean un importante problema de salud debido a su alta resistencia intrínseca a múltiples antibióticos. Conocer la cantidad y tipo de de los GRA en *Serratia* spp. permitirá tratamientos que eviten aquellos antibióticos a los que la bacteria tiene una resistencia natural o adquirida. En este trabajo encontramos que la mayoría de las cepas de *Serratia* spp. muestran resistencia a la polimixina B y son susceptibles al trimetoprim y a las sulfonamidas. Debido al alto número de GRA intrínsecos en las cepas de *Serratia* ambientales, podemos concluir que el ambiente proporciona un reservorio natural para los GRA que ha sido subestimado en el campo de la medicina.

Abstract

- Members of the *Serratia* genus are opportunistic pathogens causing nosocomial infections. Noteworthy is their resistance to a variety of antibiotic families: β -lactams, aminoglycosides, quinolones and polypeptide antibiotics. The aim of this study was to identify the genes responsible for intrinsic and acquired multidrug-resistance (resistome) in the *Serratia* genus as well as the HGT elements associated with the virulence of this genus.
- The study strain *S. marcescens* SmUNAM836 presents a plasmid, 13 genomic islands and 5 prophages containing various elements of virulence and antibiotic resistance genes.
- Phylogenomic and comparative genomic analyses were performed using 32 *Serratia* spp. genomes deposited in the GenBank from worldwide isolation sources. The whole genome for all strains was analyzed using BLASTN, CARD and ResFinder databases to identify antibiotic resistance genes (ARGs) and virulence factors. A parsimony pan-genome phylogeny was generated for 32 *Serratia* genomes derived from presence/absence of homologous genes.
- We report a resistome for *Serratia* spp. of 123 ARGs: 107 intrinsic antibiotic resistance genes (33 intrinsic ARGs and 74 efflux pump-associated genes), and 16 acquired ARGs (13 on plasmids, 2 on transposons, and the *gyrA* gene mutation). Most of the ARGs are chromosomal and few are found on mobile elements. Pathogenic and environmental strains had higher number of intrinsic ARGs, especially genes encoding efflux systems, than symbiotic strains. Nosocomial pathogens had more acquired ARGs than environmental isolates. Of the 123 ARGs, 80 are present in one or more strains from each niche, 7 are shared by pathogens and environmental strains, 2 are shared by pathogens and symbiotic strains, and one is shared by environmental and symbiotic strains. 18 ARGs were exclusively from pathogens, 14 from environmental strains and one from a symbiotic strain. The parsimony pan-genome tree shows five main clades congruent with *Serratia* spp. classification.
- *Serratia* spp. infections pose a major health problem due to their high intrinsic multidrug resistance. Knowing the genome-wide composition of ARGs in *Serratia* spp. will allow treatments avoiding those antibiotics to which the bacterium has a natural or acquired resistance. In this work we found that the majority of *Serratia* spp. display resistance to polymyxin and are susceptible to trimethoprim and sulfonamides. Due to the high number of intrinsic ARGs in environmental *Serratia*, we may conclude that the environment provides a natural reservoir for ARGs, which has been underestimated in the medical field.

1. Introducción

Las infecciones nosocomiales originadas por miembros del género *Serratia*, más comúnmente por *Serratia marcescens*, no habían sido adecuadamente identificadas hasta la segunda mitad del siglo XX, probablemente debido a la dificultad para describir taxonómicamente a esta especie. Este género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y actualmente hay descritas 16 especies y 2 subespecies. Las diferentes especies han sido aisladas de varios hábitats y pueden agruparse en patógenas, ambientales y simbióticas (tabla 1) (Mahlen, 2011).

Tabla 1. Especies y subespecies descritas actualmente del género *Serratia*, hábitat y patogenicidad reportada.

especie	año en la que fue descrita	hábitat	patogenicidad	referencias
<i>S. entomophila</i>	1988	insectos (<i>Castelytra zealandica</i>)	insectos	Grimont, et al., 1988
<i>S. ficaria</i>	1979	plantas e insectos (<i>Blastophaga psenes</i>)	humanos	Grimont, et al., 1979
<i>S. fonticola</i>	1979	agua	humanos	Gavini, et al., 1979
<i>S. glassinae</i>	2010	insectos (<i>Glossina palpalis gambiensis</i>)	no reportada	Geiger et al., 2010
<i>S. grimesii</i>	1983	agua, suelo	no reportada	Grimont, et al., 1983
<i>S. liquefaciens</i>	1931	agua, suelo, animales, insectos, plantas	humanos, insectos	Grimes, 1961
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	1823	agua, suelo, animales, insectos, plantas	humanos, insectos, animales, plantas	Bizio, 1823
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i>	1998	agua	no reportada	Ajithkumar, et al., 2003
<i>S. nematodiphila</i>	2009	nemátodos (<i>H. changmingensis</i>)	no reportada	Zhang, et al., 2009
<i>S. odorifera</i>	1978	plantas	humanos	Grimont, et al., 1978
<i>S. oryzae</i>	2017	planta de arroz	no reportada	Zhang, et al., 2017
<i>S. plymuthica</i>	1896	agua, animales, insectos, plantas	humanos	Grimont, et al., 1977
<i>S. proteamaculans</i>	1919	agua, suelo, animales, insectos, plantas	insectos, plantas	Paine, et al., 1919
<i>S. quinivorans</i>	1982	agua, suelo, animales, insectos, plantas	humanos	Ashelford, et al., 2002
<i>S. rubidaea</i>	1940	agua, plantas	humanos	Stapp, 1940
<i>S. symbiotica</i>	2008	endosimbionte secundario de áfido	no reportada	Lamelas, et al., 2008
<i>S. ureilytica</i>	2005	agua	no reportada	Bhadra, et al., 2005

Serratia marcescens y otros miembros de este género, en un menor grado, están considerados hoy en día como patógenos oportunistas causando una gran variedad de infecciones como meningitis, sepsis, infecciones del tracto urinario, piel, sistema respiratorio y ojos (Engelhart, et al., 2003; Wu, et al., 2013; Shanks, et al., 2013; Gupta, et al. 2014). *S. marcescens* se encuentra dentro de las 10 especies bacterianas más recuperadas en infecciones nosocomiales (Mahlen, 2011) y ha sido cultivada de una gran variedad de fuentes inertes como desinfectantes, broncoscopios, transductores de presión y viales de medicación multiuso (Liou, et al., 2014). Los miembros de este género poseen una gran variedad de factores de virulencia que incluyen

hemolisinas (ShlAB), proteínas del Quorum-Sensing (LuxI-R), proteínas asociadas a la producción de biopelículas (BsmAB), fosfolipasas (PhlAB), peptidasas (ClpPX) metaloproteasas (AprA), quitinasas (ChiAC), sideróforos (Ent, Fep, Fes y Fur) y hemóforos (operón *has*), el lipopolisacárido LPS y varios elementos para la movilidad y adhesión como flagelos (Fli, Flh, Flg) y fimbrias (10 operones , entre ellos el operón *smf*) (Mahlen, 2011). Una de las particularidades de los miembros de este género es el alto contenido de genes de resistencia a antibióticos que se encuentran en sus genomas, tanto en el genoma central como en el accesorio, que confieren resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y antibióticos polipéptidos, entre otros. La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca o adquirida. Es intrínseca cuando los genes de resistencia forman parte del cromosoma y se encuentran presentes en la mayoría de las cepas del género bacteriano. Se le considera adquirida cuando los genes de resistencia son transferidos horizontalmente entre las cepas de una especie, género o entre cepas filogenéticamente más distantes (Cordero, et al. 2009) a través de elementos móviles como plásmidos, integrones o islas genómicas, o cuando se producen mutaciones que confieren resistencias nuevas, generalmente puntuales, en genes de metabolismo básico como respuesta al estrés conferido por los antimicrobianos (Blair, et al., 2015; Hu, et al., 2015). Cada vez hay más evidencia de que el estrés ambiental induce inestabilidad genómica en las bacterias generando mutaciones y acelerando los procesos adaptativos (Galhardo, et al., 2007). Algunos autores definen la resistencia adquirida como el resultado de las capacidades adaptativas naturales de los microorganismos y que se pueden interpretar como un balance de compromisos evolutivos (evolutionary trade-offs) que no necesariamente requiere de la adquisición de nuevo material genético (Iredell, et al., 2016). Las bacterias utilizan varias estrategias para hacer frente a la presión de selección impuesta por los antibióticos, entre ellas están: la modificación o degradación del antibiótico, la modificación del blanco del antibiótico, la expulsión activa de los antibióticos fuera de la célula bacteriana y la modificación de la permeabilidad de la pared celular. Estos mecanismos serán descritos con más detalle, junto con los genes que los codifican y regulan, en párrafos posteriores.

Además del gran número de genes de resistencia a antibióticos que se encuentran en las bacterias patógenas y nosocomiales, es de gran relevancia el gran número de estos genes presentes en las bacterias asociadas a ambientes naturales, como el suelo, agua y plantas

(D'Costa, et al., 2006). Este hecho nos lleva a hipotetizar que el medio ambiente representa un reservorio natural de genes de resistencia que ha sido subestimado en el campo médico.

Existen numerosos estudios sobre patrones de resistencia y epidemiología del género *Serratia*. Estudios sobre susceptibilidad a antimicrobianos en diferentes unidades de terapia intensiva (UTI) muestran que *S. marcescens* es la séptima bacteria Gram-Negativa más recuperada en UTIs y que se aísla más frecuentemente de muestras de sangre y del aparato respiratorio (Bertrand y Dowzicky, 2012). Las cepas aisladas en seis diferentes regiones geográficas (América del Norte, Europa, la zona Asia-Pacífico, Medio Oriente, Latinoamérica y África) muestran patrones similares de resistencia y susceptibilidad: resistencia a todas las penicilinas y alta susceptibilidad al aminoglucósido amikacina (75% de susceptibilidad en cepas latinoamericanas y más del 90% en cepas pertenecientes al resto de las regiones de estudio). Con respecto a las cefalosporinas cefepima y ceftriaxona, se encontró 73% y 61% de susceptibilidad respectivamente en Latinoamérica y más del 74% en el resto de los continentes. Con respecto a los carbapenémicos imipenem y meropenem, más del 90% de susceptibilidad en todas las regiones. Referente a la quinolona levofloxacino, se encontró 87% de susceptibilidad en Latinoamérica y más del 92% en el resto de las regiones de estudio. Es relevante que las cepas de *S. marcescens* aisladas en Latinoamérica muestran la mayor resistencia antimicrobiana.

Brotos epidémicos de *S. marcescens* han sido reportados desde 1950 y siempre se han asociado a brotes de origen nosocomial (Mahlen, 2011). Actualmente los programas de vigilancia epidemiológica más eficientes en diferentes países (Estados Unidos de Norteamérica y en Europa), han arrojado reportes de brotes epidémicos de *S. marcescens* en UTIs de neonatos, UTIs de cirugía cardiovascular, en clínicas de cirugía ortopédica y en unidades de diálisis, la mayoría de estos brotes han sido asociados a contaminación de viales de múltiples dosis, a jeringas de heparina o de solución salina pre-cargadas, a soluciones de sulfato de magnesio y a soluciones para el control del dolor de aplicación intravenosa (Sunenshine, et al., 2007; Liu, et al., 2011; Chiang, et al., 2013; Merkier, et al., 2013; Šiširak, et al., 2013; Hervé, et al., 2015; Dawczynski, et al., 2016; Morillo, et al., 2016; Vetter, et al., 2016). También han habido algunos reportes de brotes epidémicos de *S. liquefaciens* en los últimos años (Grohskopf, et al., 2001). Sin embargo, para las demás especies de *Serratia* solo se han reportado casos aislados, como es el caso de la cepa de *S. rubidaea* aislada de un paciente con infección respiratoria en China (Yao, et al., 2016).

2. Antecedentes

2.1. Origen de la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

El interés en este trabajo se origina cuando nuestro laboratorio recibe una serie de cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes adultos con neumonía asociada a la instalación de ventilador automático e internados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México. Estas cepas se caracterizaron genética y fenotípicamente en nuestro laboratorio generándose una publicación (Morales-Espinosa et al., 2012). Dentro de este grupo de cepas, hubo algunas que presentaron patrones bioquímicos y genéticos diferentes a los típicos de *Pseudomonas aeruginosa*, como por ejemplo patrones de electroforesis de campos pulsados (PFGE) de 7 bandas usando la enzima *CeuI*, que son los patrones de enterobacterias y no el patrón esperado de 4 bandas característico de *Pseudomonas aeruginosa*. Con el fin de clasificar correctamente a estas cepas se mandaron a secuenciar los genes del 16s rRNA. Las secuencias del 16s rRNA arrojaron una identidad del 99% y 100% con *Serratia marcescens*. Sin embargo, entre estas cepas identificadas como *S. marcescens* hubo una cepa que llamó nuestra atención porque presentaba características fenotípicas de *P. aeruginosa* como oxidasa positiva, crecimiento en medio PIA a 42°C y amplificación por PCR de genes de virulencia exclusivos de *P. aeruginosa* como *lasB*, *lecA*, *plcH*, *phzA1*, *toxA*, *toxR* y *algR*. Para explicar la razón por la que esta cepa genéticamente era una *S. marcescens* pero presentaba características fenotípicas de *P. aeruginosa* se procedió a realizar un análisis más minucioso, iniciando por la observación microscópica de su crecimiento colonial a través de un microscopio estereoscópico, el cual mostró el crecimiento de dos colonias estrechamente unidas y con diferentes morfologías (figura 1). Se hicieron re-aislamientos consecutivos hasta obtener colonias únicas y separadas. Cada una de estas colonias se analizaron bioquímicamente utilizando el kit API 20E. Uno de estos aislamientos presentó una coincidencia del 99% con *S. marcescens*, mientras que el otro correspondía a *P. aeruginosa*. La cepa de *Serratia marcescens* se denominó *S. marcescens* SmUNAM836. El crecimiento estrecho de ambas especies (*S. marcescens* y *P. aeruginosa*) explicaría la detección de los genes de virulencia característicos de *P. aeruginosa* a partir del DNA extraído de una colonia aparentemente pura. Una vez aislada la cepa de *S. marcescens* SmUNAM836 como colonia única y separada de la de *P. aeruginosa*, fue sembrada en un medio sólido LB y sometida de nuevo a las pruebas bioquímicas API 20E, API 20NE y oxidasa, donde

se obtuvieron los resultados esperados para una *S. marcescens*, con la excepción de la oxidasa que dio positiva pero lenta.

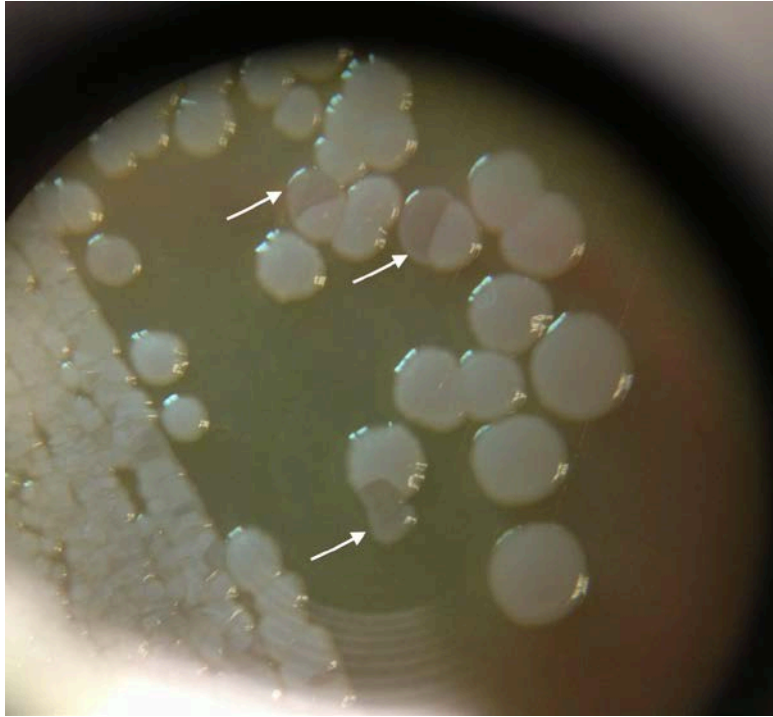


Figura 1. Imagen del microscopio bifocal donde se muestran dos colonias con diferentes morfologías creciendo estrechamente juntas. Las colonias de aspecto blanco y perlado pertenecen a *S. marcescens* SmUNAM836 y las de aspecto aplanado y oscuro a *P. aeruginosa* (indicadas con una flecha).

3. Justificación

Serratia marcescens es un patógeno oportunista involucrado en el desarrollo de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Al inicio de este doctorado, la información que se tenía a nivel genómico del género *Serratia* era muy escasa, por lo que se determinó mandar a secuenciar la cepa de *S. marcescens* SmUNAM836, aislada de un paciente con neumonía asociada a la instalación de ventilador automático. A partir de la información generada del genoma completo, la cepa se caracterizará de acuerdo a su contenido de genes de virulencia, genes de resistencia a antimicrobianos (intrínseca y adquirida) y presencia de elementos móviles transferidos a través de eventos de transferencia horizontal como plásmidos, islas genómicas y profagos.

Usando esta cepa como referencia y otras 31 cepas ya secuenciadas pertenecientes a diferentes especies de *Serratia* y depositadas en la base de datos GenBank, se realizó un estudio de genómica comparativa de este género. El análisis genómico comparativo de diferentes especies dentro de un género permitió establecer las características genéticas que presentan las especies patógenas y no patógenas y cuáles se asocian a la virulencia y a la patogénesis. Además, se pudo definir la participación de la transferencia horizontal de genes en la emergencia de un patógeno oportunista hasta consolidarse como un patógeno real.

4. Objetivos

Objetivo General

Determinar el papel de la transferencia horizontal en la evolución de la virulencia y resistencia a antibióticos del género *Serratia*.

Objetivos Particulares

1. Secuenciar el genoma completo de la cepa de *Serratia marcescens* SmUNAM836, ensamblarlo, editarlo, anotar su contenido genético y posteriormente subirlo a la base de datos GenBank.
2. Identificar y determinar el contenido genético de los elementos móviles de la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836: islas genómicas, profagos, secuencias de inserción y plásmidos.
3. Identificar los genes de resistencia antimicrobiana intrínseca y adquirida en la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836.
4. Realizar un análisis de genómica comparativa con los genomas completos de las cepas de *Serratia* spp. de la base de datos GenBank con el fin de identificar el resistoma de este género y los elementos asociados a transferencia horizontal que juegan un papel relevante en su patogénesis.
5. Construir una filogenia del género *Serratia* basada en los genes homólogos del pangenoma y ver el número de determinantes de resistencia asociado a cada clado y especie.

5. Materiales y Métodos

5.1. Secuenciación del genoma de la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

Esta cepa fue aislada de lavado bronquial de un paciente de 57 años de edad con enfermedad pulmonar crónica internado en la unidad de cuidados intensivos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS en la Ciudad de México. A partir de un cultivo originalmente identificado como *P. aeruginosa*, esta cepa fue re-aislada con ayuda de un microscopio estereoscópico. El desarrollo del proyecto se realizó en el Laboratorio de Genómica Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México identificando la cepa como una *Serratia marcescens* mediante las pruebas bioquímicas clásicas, la prueba API 20E y posteriormente mediante su secuencia del 16s rRNA ribosomal. Algunas de las características particulares de esta cepa es que es no-pigmentada y es oxidasa positiva lenta. El DNA genómico fue purificado a partir de un desarrollo de colonia única, usando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) y posteriormente enviado al centro de análisis genómico de la universidad de Yale, USA (YCGA). Se utilizó el método de secuenciación PacBio RS II SMRT. Se preparó una librería estándar de fragmentos de 10-kb que se secuenciaron en tres celdas SMRT utilizando la química P4-C2. Los reads largos fueron usados como semillas para el ensamblado de los reads más cortos mediante el protocolo HGAP/Quiver (Chin, et al., 2013) resultando en solo 2 contigs, uno correspondiente al cromosoma y el otro a un plásmido. Ambos fueron circularizados cortando las secuencias repetidas terminales con Minimus2 (Treangen, et al., 2012). La secuencia se pulió remapeando dos veces más los reads con el módulo RS_Resequencing.1.

La anotación automática se realizó de forma jerárquica, primero se anotaron los rRNAs con el programa Barrnap (BASIC Rapid Ribosomal RNA Predictor), luego los tRNAs y tmRNAs con Aragorn (Laslett, et al., 2004), los CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) con el programa MinCED (Bland, et al., 2007), los ncRNAs (RNAs no codificantes) con el programa Infernal (Nawrocki, et al., 2013) y los péptidos señal con el programa SignalP (Petersen, et al., 2011). Posteriormente se procedió a anotar automáticamente los marcos de lectura abiertos (ORFs, Open Reading Frames) utilizando un programa modificado de Prokka (Seemann, 2014). Se utilizó el programa GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013) para encontrar la cepa mas parecida a la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 y facilitar su anotación. Esto se hizo comparando todas las secuencias de los genomas completos

de *Serratia* spp. depositados en la base de datos del GenBank con la cepa *S. marcescens* SMUNAM836 con base a clusters de proteínas homólogas. Se encontró que el genoma de la cepa de *S. marcescens* SM39 fue el que presentó mayor identidad nucleotídica y sintenia con la cepa SmUNAM836 (Iguchi, et al., 2014). La anotación fue curada manualmente utilizando los siguientes programas y bases de datos: Prodigal, para predicción de genes codificantes (Hyatt, et al., 2010), BLAST+, para la búsqueda de genes en bases de datos de proteínas (Camacho, et al., 2009), Pfam para la búsqueda de familias de proteínas basadas en UniProt Reference Proteomes (Finn, et al., 2016) y NCBI's CDD para anotar proteínas con base en dominios conservados de secuencias de proteínas (Marchler-Bauer, et al., 2007).

5.2. Identificación de elementos móviles y genes de virulencia de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

Se identificaron los elementos móviles como plásmidos, islas genómicas, profagos, integrones y transposones, así como los genes responsables de la virulencia de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836. Los plásmidos se identificaron durante la secuenciación y ensamble, las islas genómicas con el programa IslandViewer3 (Dhillon, et al., 2015), los profagos con el programa PHAST (Zhou, et al., 2011) y phiSpy (Akhter, et al., 2012), los integrones y transposones con el programa ISfinder (Siguiet, et al., 2006) y los genes de virulencia con la base de datos VFDB, the Virulence Factor DataBase (Chen, et al., 2016).

5.3. Identificación de genes de resistencia a antibióticos en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836

Se utilizó la información de los genes de resistencia y bombas de eflujo disponible en el artículo referente a la cepa *S. marcescens* SM39, la cual, además de ser la cepa más cercana filogenéticamente a la cepa *S. marcescens* SmUNAM836, presentó la mayor identidad nucleotídica y sintenia con la cepa SmUNAM836 (Iguchi, et al., 2014). Una vez localizados los genes de resistencia en el genoma de *S. marcescens* SmUNAM836, éstos fueron analizados con el programa BLASTN (Altschul, et al., 1990). La búsqueda se refinó usando las bases de datos CARD (a Rigorously Curated Collection of Known Resistance Determinants) (McArthur, et al. 2013) y ResFinder (Zankari, et al., 2012) con el fin de identificar genes únicos de esta cepa.

Mutaciones de genes asociados a resistencia antimicrobiana fueron identificadas con los programas BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) y MEGA7 (Kumar, et al., 2008).

5.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836

Se determinaron los perfiles de susceptibilidad de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 a 24 antimicrobianos por el método de dilución en agar de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016). Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fueron usados como controles validando el ensayo de susceptibilidad. Los antibióticos probados fueron: carbenicilina (4-16 µg/ml), ticarcilina (4-16 µg/ml), piperacilina (1-4 µg/ml), ticarcilina/ácido clavulánico (4/2–16/2 µg/ml), amoxicilina/ácido clavulánico (2/1-8/4 µg/ml), piperacilina/tazobactam (1/4–4/4 µg/ml), ceftazidima (0.06-0.5 µg/ml), ceftriaxona (0.03-0.12 µg/ml), cefotaxima (0.03-0.12 µg/ml), cefepima (0.015-0.12 µg/ml), imipenem (0.06-0.25 µg/ml), meropenem (0.008-0.06 µg/ml), aztreonam (0.06-0.25 µg/ml), amikacina (0.5-4 µg/ml), gentamicina (0.25–1 µg/ml), tobramicina (0.25–1 µg/ml), polimixina B (0.25–2 µg/ml), ciprofloxacina (0.004-0.015 µg/ml), norfloxacina (0.03-0.12 µg/ml), levofloxacina (0.008-0.06 µg/ml), ácido nalidixico (1-4 µg/ml), cloranfenicol (2-8 µg/ml), tetraciclina (0.5-2 µg/ml) y trimetoprima/sulfametoxazol (\leq 0.5-9.5 µg/ml). Se manejaron diluciones en un rango de 0.125 a 256 µg/ml de concentración para cada antibiótico. Las placas de agar Mueller-Hinton con las diferentes concentraciones de antibioticos fueron inoculadas con 10 µl del inóculo estándar (10^8) de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 utilizando un robot Virtek Chipwriter™. Las placas de agar con el antibiótico fueron incubadas a 37°C durante 16 a 24 horas. Terminado el período de incubación se procedió a la lectura. La cepa fue susceptible a un antibiótico cuando hubo inhibición del crecimiento por debajo o dentro del punto de corte. Se tomó como resistencia intermedia cuando hubo crecimiento con una dilución por arriba del punto de corte, pero inhibición del desarrollo a una concentración mayor. Se consideró resistente cuando se observó crecimiento por arriba del punto de corte.

5.5. Análisis de genómica comparativa con los genomas completos de las cepas de *Serratia* spp. de la base de datos GenBank con el fin de identificar los elementos asociados a transferencia horizontal

Se realizó un análisis de genómica comparativa utilizando 32 cepas de diferentes especies de *Serratia* cuyos genomas se encuentran depositados en la base de datos GenBank del NCBI y donde se incluye la cepa *S. marcescens* SmUNAM836. Estas cepas fueron aisladas de diferentes nichos ecológicos que incluyen hospitales y ambientes naturales como agua y suelo, pertenecientes a 19 países de 4 continentes (tabla 2). Este análisis se realizó con el fin de identificar elementos adquiridos por transferencia horizontal y asociados a la patogénesis del género *Serratia*. Se utilizó la herramienta bioinformática Mauve 2.4.0 (Darling, et al., 2010) para poder identificar por homología de secuencias los genes cromosómicos asociados con la patogénesis de cada cepa y poder identificar si se encuentran asociados a algún elemento móvil. La identificación de los genes asociados con la resistencia a antibióticos adquirida por transferencia horizontal en plásmidos o islas genómicas se realizó mediante los programas BLASTN y la base de datos CARD.

5.6. Relaciones filogenéticas del género *Serratia* y número de determinantes de resistencia

Se construyó un dendrograma de los 32 genomas con el programa GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). Este programa genera árboles pangenómicos de parsimonia que muestran las relaciones filogenéticas de los proteomas con base a la ausencia o presencia de genes homólogos por lo que reflejan mejor el potencial fenotípico de la muestra. También se usó el programa GET_HOMOLOGUES con el propósito de cuantificar y agrupar el número de genes homólogos compartidos por los 32 genomas.

Tabla 2. Lista de los 32 genomas de *Serratia* spp. analizados. En las columnas se muestra la fuente de aislamiento de la cepa, región geográfica, continente, número de referencia del NCBI, tamaño del genoma y características particulares.

Cepa	Fuente de aislamiento	Región geográfica	Continente	No. de referencia NCBI	Tamaño del genoma (pb)	Características particulares
<i>S. marcescens</i> SmUNAM836	patógeno nosocomial/sist. respiratorio	México	América	NZ_CP012685.1	5207023	no pigmentada/ 1 plásmido
<i>S. marcescens</i> SM39	patógeno nosocomial/septicemia	Japón	Asia	NZ_AP013063.1	5225577	no pigmentada/ 2 plásmidos
<i>S. marcescens</i> CAV1492	patógeno nosocomial/sist. respiratorio	Virginia, USA	América	NZ_CP011642.1	5477084	5 plásmidos
<i>S. marcescens</i> U36365	patógeno nosocomial/orina	Vellore, India	Asia	NZ_CP016032.1	5125966	productora de pigmento verde
<i>S. marcescens</i> SM82099	patógeno nosocomial/epidemia infantil	Giessen, Alemania	Europa	NZ_HG738868.1	5123091	causó una epidemia infantil en Alemania
<i>S. liquefaciens</i> HUMV-21	patógeno nosocomial/úlceras en piel	Santander, España	Europa	NZ_CP011303.1	5326657	altamente citotóxica
<i>S. liquefaciens</i> FDAARGOS_125	patógeno nosocomial	Washington DC, USA	América	NZ_CP014017.1	5204595	relevancia médica
<i>S. rubidaea</i> 1122	patógeno nosocomial/esputo	Beijing, China	Asia	NZ_CP014474.1	4922834	primer genoma de <i>S. rubidaea</i> secuenciado
<i>S. marcescens</i> Db11	patógeno de insecto (<i>Drosophila</i>)	Suecia	Europa	NZ_HG326223.1	5113802	no pigmentada
<i>Serratia</i> sp. SCBI	patógeno de nemátodo (<i>Caenorhabditis briggsae</i>)	África del Sur	Africa	NZ_CP003424.1	5034608	1 plásmido
<i>S. marcescens</i> ISC-14	asociada a plantas (<i>Solanum nigrum</i>)	Corea del Sur	Asia	NZ_CP012639.1	5127030	relevancia en la agricultura
<i>S. marcescens</i> B3R3	asociada a plantas (<i>Zea mays</i>)	Shandong, China	Asia	NZ_CP013046.1	5471439	relevancia en la agricultura/ 1 plásmido
<i>S. urelytica</i> Ir5/4	aguas termales	Lirima, Chile	América	NZ_SF800000000.1	5391360	aislamiento de un sitio de altitud elevada
<i>Serratia</i> sp. YD25	rizósfera	Fujian, China	Asia	NZ_CP016948.1	5117644	relevancia en la agricultura
<i>Serratia</i> sp. FS14	planta medicinal (<i>Atractylodes macrocephala</i>)	Jiangsu, China	Asia	NZ_CP005927.1	5249675	actividad antagonista contra patógenos de plantas
<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006	agua de una salina	Cheesequake, NJ, USA	América	NZ_AWXH000000000.1	4944790	pigmentada/ productora de vesículas de gas
<i>S. marcescens</i> WW4	aguas residuales	Taiwan	Asia	NC_D020211.1	5241455	formadora de biopelículas con <i>P. aeruginosa</i> / 1 plásmido
<i>S. fonticola</i> G52	asociada a una planta de ajonjolí	Corea del Sur	Asia	NZ_CP013913	6100511	2 plásmidos
<i>S. fonticola</i> DSM 4576	agua potable	Francia	Europa	NZ_CP011254.1	6000511	promotoras del crecimiento vegetal
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	leche	Cork, Irlanda	Europa	NC_D21741.1	5238612	crecimiento en condiciones de baja presión/ 1 plásmido
<i>C. multitudinisentens</i> R8-25	suelo de un vertedero de basura	Malasia	Asia	NZ_CP007044.2	5488183	actividad quimiotáctica
<i>S. plymuthica</i> 4Rz13	rizósfera de una planta de papas	Rostock, Alemania	Europa	NC_D21591.1	5328010	síntesis de compuestos volátiles (sodorifen)/ 1 plásmido
<i>S. plymuthica</i> 3Rp8	planta de canola (<i>Brassica napus</i>)	Braunschweig, Alemania	Europa	NZ_CP012096.1	5546041	actividad antagonista contra hongos fitopatógenos
<i>S. plymuthica</i> AS9	planta de canola (<i>Brassica napus</i>)	Uppsala, Suecia	Europa	NC_D15567.1	5442880	promotoras del crecimiento vegetal
<i>S. plymuthica</i> AS12	planta de canola (<i>Brassica napus</i>)	Uppsala, Suecia	Europa	NC_D15566.1	5443009	actividad quimiotáctica
<i>S. plymuthica</i> S13	asociada a la calabaza (<i>Cucurbita pepo</i>)	Graz, Austria	Europa	NC_D21699.1	5467306	promotoras del crecimiento vegetal
<i>S. plymuthica</i> RVH1	procesamiento de vegetales crudos	Bélgica	Europa	NZ_ARW001000001.1	5514320	crecimiento a bajas temperaturas (0-32 °C)
<i>S. plymuthica</i> PR1-2C	rizósfera de una planta de maíz	Holanda	Europa	NZ_CP015613.1	5474685	actividad antagonista contra patógenos de plantas
<i>S. proteamaculans</i> 568	endófito de raíz (<i>Populus trichocarpa</i>)	Washington State, USA	América	NC_D09832.1	5448853	promotoras del crecimiento vegetal/ 1 plásmido
<i>Serratia</i> sp. FGI94	simbionte de un hongo	Panamá	América	NC_D20064.1	4858216	productora de compuestos nitrogenados
<i>S. nematophilis</i> DSM 21420	simbionte de un nemátodo y parásito de un insecto	Shanghai, China	Asia	NZ_JPUX000000000.1	5224920	pigmentada y fluorescente
<i>S. symbiotica</i> srt. "Cinara cedri"	endosimbionte de un áfido (<i>Cinara cedri</i>)	Valencia, España	Europa	CP002295.1	1762765	simbionte co-obligado

6. Resultados

6.1. Secuenciación de la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

El ensamblado final de la cepa SmUNAM836 presentó una cobertura media de ~172x y consiste en un cromosoma de 5,207,023 pb con un contenido de G+C promedio de 59.71% y un plásmido de 26,346 pb con un contenido promedio de G+C de 43.52 %. La anotación de genes fue realizada con una versión modificada de Prokka (Seemann, 2014). Un total de 4,961 genes fueron anotados: 4788 CDSs, 95 tRNAs, 22 rRNAs, y 1 tmRNA; adicionalmente 45 ncRNAs, 3 riboswitches y 502 péptidos señal fueron identificados en el genoma. No se encontraron repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR). La anotación fue manualmente curada usando los programas y bases de datos arriba mencionados. Adicionalmente se identificaron 6 profagos mediante el programa PHAST (Zhou, et al., 2011) y 45 probables islas genómicas con el programa IslandViewer3 (Dhillon, et al., 2015).

El genoma de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 se depositó en la base de datos del GenBank (NCBI) con el número de acceso [NZ_CP012685.1](#). generándose una publicación (Sandner-Miranda, et al., 2016).

6.2. Escrutinio de elementos móviles y genes de virulencia de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836

6.2.1. Plásmido pSmUNAM836

El genoma de esta cepa tiene un plásmido de 26,346 pb (37 genes) el cual presentó un contenido bajo de G+C (42.52%) y un ~97% de identidad con secuencias de diversos plásmidos del género *Enterobacter* específicamente con el plásmido de *Enterobacter hormaechei* subespecie *oharae* cepa 34399 (plásmido p34399-43.500kb) y con el plásmido pKPC-f91 de *Enterobacter cloacae* cepa ECNIH2 (que es un plásmido asociado a *Klebsiella pneumoniae*) (figura 2). El plásmido pSmUNAM836 tiene el gen *insA* que es una transposasa que codifica la secuencia de inserción IS-2, además presenta el gen que codifica para la proteína VirB del sistema de secreción de tipo IV y el gen que codifica para la proteína de conjugación Trb1/VirB-6. Asimismo presenta el transposón Tn3 que codifica para la β -lactamasa clase A Bla_{Tem-1}, para la Tn3 transposasa y para una resolvasa. También tiene los genes *ccdAB* que codifican para el sistema toxina-antitoxina. El genoma del plásmido pSmUNAM836 fue depositado en la base de datos GenBank (NCBI) con el número de acceso [NZ_CP012686.1](#).

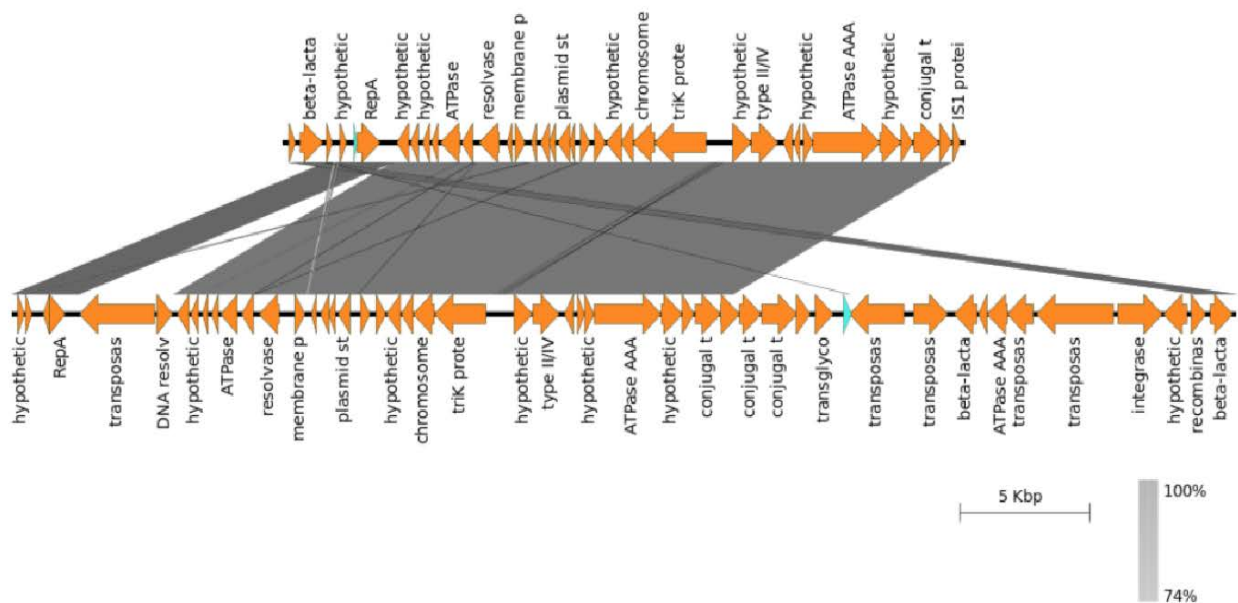


Figura 2. Alineamiento de los plásmidos pSmUNAM836 de *S. marcescens* (secuencia de arriba) y el plásmido pKPC-f91 de *Enterobacter cloacae* (secuencia de abajo).

6.2.2. Islas Genómicas identificadas en la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

Se identificaron 45 probables islas genómicas con el programa IslandViewer3 (figura 3) y se curaron posteriormente con base a los siguientes criterios: constan de un grupo de genes ausentes en otras *S. marcescens*, poseen diferente contenido de G+C que el del cromosoma de la especie, están asociadas a genes de tRNA y/o a integrasas y poseen genes de virulencia, resistencia a antimicrobianos o genes adaptativos. Según estos criterios la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 presenta 13 islas genómicas que se describen brevemente a continuación. Para mayor detalle ver la tabla 3.

Isla genómica 1 (SmuGEI-1)

Esta isla está insertada en el gen tRNA-Thr en su extremo 5', contiene 11 ORFs (Open Reading Frames) y tiene un contenido de G+C de 56.62% (el del cromosoma es de 59.71%). Contiene un gen para la formación de bio-películas, el gen *bsmB*, pero no tiene el gen *bsmA*, ambos genes son regulados por Quorum-Sensing para la formación de bio-películas (Labbate, et al., 2004). También tiene un gen putativo del citocromo b561. La isla completa presenta 99% de homología con un grupo de genes de la cepa *S. marcescens* Sm39. La región 5' de la isla presenta homología con genes de transporte a través de la membrana de *E. coli*.

Isla genómica 2 (SmuGEI-2)

Esta isla genómica presenta 31 ORFs, tiene un contenido de G+C de 47.45% pero no se encuentra asociada a ningún gen de tRNA o integrasa. En su región 5' se encuentran los genes responsables de la biosíntesis del polisacárido capsular o antígeno K (*wzcABC*) con 98% de identidad y 100% de cobertura con *Klebsiella* sp. D5050, indicando un probable evento de transferencia horizontal entre estos dos microorganismos. En la parte media de la isla se encuentran los genes *kdsB*, *legI*, *lsg* y *rfbU* asociados con la biosíntesis del lipopolisacárido LPS y antígeno O de enterobacterias. Igual que con los genes del antígeno capsular, esta región presenta una alta homología con genes de *Klebsiella* sp. D5050. En su región 3' se encuentran los genes del sistema de secreción de tipo I *lipBCD* que presentan una alta identidad con el resto de las cepas de *Serratia marcescens* pero también con cepas del género *Erwinia* (85%). Esta isla es un ejemplo del mosaicismo presente en islas genómicas.

Isla genómica 3 (SmuGEI-3)

La isla 3 presenta 20 ORFs, 58.03% de G+C y está asociada a 2 genes de tRNA, uno en su región 5', tRNA-Ser y otro en la región 3', tRNA-Lys. Contiene los genes necesarios para la biosíntesis de fimbrias y mantienen una alta identidad con los genes de las demás *S. marcescens* y una identidad del 68% con cepas de *Enterobacter cloacae*. También tiene la bomba de eflujo MexGHI que presenta 82% de identidad con *P. aeruginosa* y que confiere resistencia a norfloxacin (Aendekerk, et al., 2005). Esta bomba de eflujo pertenece a la familia RND (Resistance-Nodulation-Division).

Isla genómica 4 (SmuGEI-4)

La isla genómica 4 posee 25 ORFs y un contenido promedio de 57.57% de G+C, pero es interesante notar que en su región 5' el contenido de G+C es de 53.48% y en su región 3' de 62.24%. Está asociado a un tRNA-Ser que se encuentra ubicado 4 ORFs cromosómicos río abajo de la isla. Presenta 2 genes para la secreción de microcina H47 y 5 para la síntesis de bacteriocina, antimicrobianos producidos por las bacterias. Los 5 genes relacionados a la síntesis de bacteriocina sólo están presentes en 6 cepas de *S. marcescens* y presentan una alta identidad entre ellos (entre el 100 y el 93%). También tiene el gen de la subunidad III del citocromo C, el citocromo *cbb-3* oxidasa, el cual tiene un 74% de identidad con el gen de *Pseudomonas putida*. Este gen se encuentra presente en todas las especies de *Serratia* de este estudio.

Isla genómica 5 (SmuGEI-5)

La isla 5 contiene 30 ORFs, un contenido promedio de G+C de 63.69% y no se encuentra asociada a ningún gen de tRNA o integrasa. Esta isla presenta en su región 5' el gen sideróforo sintetasa *cbsF* que contiene módulos de sintetasa de péptidos no ribosómicos y que está presente en todas las cepas del género *Serratia*. Además, las bombas de eflujo multidrogas MexPQ-OprE que confiere resistencia a macrólidos (Mima, et al., 2005) y que presenta una identidad del 84% con *P. aeruginosa* PA7. En su región 3' presenta genes del citocromo C con 72% de identidad con *Pseudomonas chlororaphis* PA23. Estos genes podrían ser la razón por la que la cepa SmUNAM836 es oxidasa positiva lenta.

Isla genómica 6 (SmuGEI-6)

La isla 6 contiene 14 ORFs, un promedio de 61.94% de contenido de G+C y está asociada en su extremo 5' a un tRNA-Asn. Presenta el gen de la polimerasa del antígeno O (*wzy*) que también está presente en las demás cepas de *Serratia*, un gen homólogo a *alkB* que está asociado a la reparación de daños al DNA (Begley, et al. 2003) y los genes del sistema toxina/antitoxina HigA-HigB que juegan un papel importante en la regulación de la virulencia (Lobato-Márquez, et al., 2016). Estos últimos sólo presentan homología con una cepa de *S. marcescens*, la cepa PWN146.

Isla genómica 7 (SmuGEI-7)

La isla genómica 7 tiene 9 ORFs, 50.16% de contenido promedio de G+C y no está asociado con ningún tRNA o integrasa. La isla 7 presenta en su región 5' un gen que codifica para una lipasa putativa esencial para la desintegración de cuerpos autofágicos dentro de las vacuolas. Este gen presenta alta identidad y cobertura sólo con otras 3 cepas de *Serratia*, *S. marcescens* AS1, *S. marcescens* CAV1492 y *Serratia* sp. SCBI. También contiene 2 genes que codifican para un motivo proteico que contiene repeticiones de anquirina y que se presume son adquiridos por transferencia horizontal de los eucariontes. Este motivo interactúa con proteínas de las células de los hospederos (patógenos o simbioses) para poder manipularlas. Estas proteínas juegan un papel importante en la patogénesis microbiana mimetizando o interfiriendo con las funciones del hospedero (Al-Khodori, et al., 2010). Esta isla posee una región de alrededor 3900 pb de proteínas hipotéticas que tienen homología con genes de *Pectobacterium wasabiae* RNS08.42.1 (92% de identidad y 50% de cobertura).

Isla genómica 8 (SmuGEI-8)

La isla genómica 8 contiene 6 ORFs, tiene 64.15% de G+C y está insertada en un tRNA-Thr y en un tRNA-Ser en su extremo 3'. Esta isla está asociada a genes para la supervivencia en ambientes anaeróbicos y más específicamente dentro de macrófagos. Presenta todo el operón Ttr que codifica para la enzima tetrionato reductasa y que permite a la bacteria reducir el tetrionato a tiosulfato (McNally, et al., 2016). También tiene el gen *msgA* que codifica para la proteína de virulencia MsgA que se asocia a elementos móviles y que permite a la bacteria sobrevivir dentro de macrófagos (Gunn, et al., 1995; Lee, et al., 2013). Estos genes le dan una ventaja adaptativa a las bacterias en condiciones anaerobias. La isla tiene homología con las cepas de *S. marcescens* y con *Klebsiella oxytoca* CAV1374 (71% de identidad).

Isla genómica 9 (SmuGEI-9)

Esta pequeña isla consta de 5 ORFs, su contenido de G+C es de 43.67% y está insertada en un tRNA-Ala en su extremo 3'. La isla contiene 4 genes que codifican para la biogénesis de fimbrias y un gen que codifica para una proteína hipotética. Sólo se encontró en otras 4 cepas de *S. marcescens*: *S. marcescens* SMB2099, *S. marcescens* CAV1492, *S. marcescens* AS1 y *S. marcescens* Sm39 con identidades de 99%, 95%, 73% y 72% respectivamente con respecto a la isla de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

Isla genómica 10 (SmuGEI-10)

La isla genómica 10 presenta 9 ORFs, 48.34% de contenido promedio de G+C y no se encuentra asociada a ningún tRNA o integrasa. Tiene genes asociados a virulencia: un gen que codifica para una proteína autotransportadora relacionada a adhesión, agregación e invasión presente en las demás cepas de *Serratia* de este estudio y los genes del sistema regulador de dos componentes LuxR asociados a Quorum-Sensing que también están en las demás cepas de *Serratia* pero que tienen una identidad del 91% con una cepa de *Klebsiella michiganensis*. Además tiene un gen que codifica para una proteína hipotética que solamente comparte con una cepa de *Erwinia billingiae*.

Isla genómica 11 (SmuGEI-11)

La isla 11 consta de 18 ORFs, con un contenido de 57.59% de G+C y asociada a 2 integrasas, una en su extremo 5' (*xerC*) y la otra hacia el extremo 3' (*xerD*). Presenta genes que codifican para el ensamble de fimbrias y también el regulador transcripcional RcsB que regula motilidad y formación de bio-películas (Salscheider, et al., 2014). Además, presenta 3 genes que

codifican para la bomba de eflujo de macrólidos EstABC que de acuerdo a la base de datos de CARD tienen 42% de homología con las bombas de *Neisseria gonorrhoeae*. Esta isla tiene homología con otras 6 regiones (con cobertura del 100%) de cepas de *S. marcescens* siendo la más parecida la de *S. marcescens* B3R3 (91%). Está ausente en la cepa *S. marcescens* Sm39 que es la cepa más parecida a la *S. marcescens* SmUNAM836.

Isla genómica 12 (SmuGEI-12)

La isla 12 consta de un solo ORF de 18629 pb. Su contenido de G+C es de 64.64% y está asociado a un tRNA-Gly que se encuentra a 6 ORFs río arriba de la isla. Consta únicamente de los módulos de la sintetasa no-ribosomal de péptidos que se encarga de sintetizar péptidos pequeños involucrados en procesos de resistencia a antimicrobianos y supresión del sistema inmune del hospedero (Challis, et al., 2004). Solamente otras 4 cepas de *S. marcescens* poseen esta región con una identidad de 99 a 92% con respecto a la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

Isla genómica 13 (SmuGEI-13)

La isla 13 presenta 9 ORFs y un contenido promedio de G+C de 64.65%. No se encuentra asociada con ningún tRNA o integrasa. La característica más relevante de esta isla es que tiene un gen que codifica para la pioquelina que es un receptor de hierro (sideróforo) en su forma férrica (Fe III) típico de *P. aeruginosa* (Brandel, et al., 2012) y que presenta una identidad genómica del 72% con la pioquelina de *P. aeruginosa* PA7 indicando este hecho una posible transferencia horizontal entre estas dos especies.

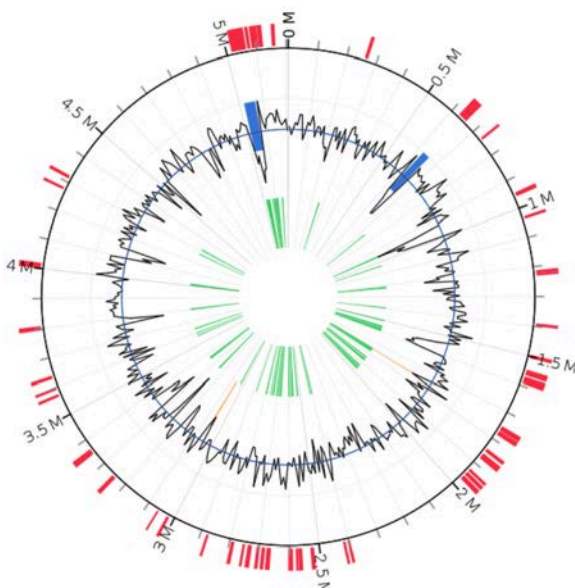


Figura 3. Identificación de islas genómicas con el programa IslandViewer3: 48 identificadas por diversos métodos (barras rojas), 45 por IslandPick (barras verdes), 2 por SIGI-HMM (barras naranjas) y 2 por IslandPath-DIMOB (barras amarillas).

6.2.3. Profagos identificados en la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

Se identificaron 6 profagos mediante el programa PHAST y el programa phiSPY (figura 4). Los criterios que se usaron para curar estas secuencias dentro del cromosoma de *S. marcescens* SmUNAM836 fueron: presencia de genes que codifican proteínas de fagos, sitios específicos de inserción como las integrasas y recombinasas, segmentos de DNA no compartidos con otros miembros del género *Serratia* y desviación del porcentaje de G+C de la media del cromosoma bacteriano.

Profago 1 (Smup-1)

Este profago es quimérico, su genoma es un mosaico de módulos de varias familias de virus y que pueden recombinar con profagos que están infectando a la misma célula (Botstein, 1980). Posee remanentes del profago lambda ($\epsilon 14$ y Q_{in}) y genes de 5 diferentes categorías: de modificación y recombinación, el de la C-5 citosina DNA metiltransferasa y la N-6 adenina metiltransferasa cuyas funciones es proteger al fago de las endonucleasas del hospedero (Murphy, et al., 2013), también tiene el gen *rusA* asociado a la recombinación y reparación del DNA. Posee genes asociados a la integración, regulación de la transcripción, genes estructurales de bacteriófago y proteínas hipotéticas.

Profago 2 (Smup-2)

Este profago contiene genes asociados a la modificación y recombinación (un gen de la N-6 adenina metiltransferasa), a la integración (una integrasa putativa hacia el extremo 5'), a la interacción con el hospedero (motivo proteico con repeticiones de anquirina y un gen que codifica para una lipasa putativa esencial para la desintegración de cuerpos autofágicos dentro de las vacuolas, similar a los de la isla genómica 7), a la regulación de la transcripción (factor sigma de la RNA polimerasa), a la replicación del fago, al ensamble estructural del fago, también genes asociados a la fase lítica del fago (holín, una proteína que inicia la ruptura de la membrana celular bacteriana) y proteínas hipotéticas. El gen que codifica para la terminación del ensamble de la cola del fago proteína R (GpR) es homólogo al del fago P2 que infecta a *E. coli*.

Profago 3 (Smup-3)

Este profago tiene en su extremo 5' un gen que codifica para una integrasa, además tiene los genes de modificación y recombinación (adenine-specific modification methylase), un gen que codifica para una endonucleasa (HNH endonucleasa), dos genes reguladores para mantener la lisogenia (represor CI y CII), un gen regulador para detener la transcripción durante la fase

lítica temprana (represor Cro). Tiene también el regulador Rha. Este profago contiene genes para la replicación del fago (phage O protein) y el gen para el inicio de la fase lítica (proteína de antiterminación). Tiene un gen que codifica para una lisozima para iniciar la infección o para lisar la pared celular durante la fase lítica, además de la spanina. Una DNA polimerasa y todos los genes para la estructura y ensamble del bacteriófago. Tiene también el elemento de inserción IS1. Llama la atención que tiene genes de un fago críptico (fago Rac). Los fagos crípticos pueden ayudar a las bacterias a sobrevivir en ambientes adversos (Wang, et al., 2010).

Profago 4 (Smup-4)

El profago 4 tiene en su extremo 5' un gen que codifica para un sistema SOS de mutagénesis (*humD*) que es homólogo a *umuD'* de enterobacterias. Se presume que la proteína HumD de fago facilita la SOS mutagénesis en *E. coli* (McLennan, et al., 1999). También presenta genes que codifican lisozimas (proteína de lisis S), seguidos por los genes que codifican las proteínas estructurales, de ensamble y de empaque de DNA. Además, presenta el gen que codifica para una transglicolasa lítica que usa el fago para entrar o salir del hospedero, una acetiltransferasa, una DNA helicasa, genes reguladores de la transcripción, una excisionasa (para poder salir del cromosoma bacteriano), una integrasa en su extremo 3' (para poder integrarse al cromosoma bacteriano) y proteínas hipotéticas.

Profago 5 (Smup-5)

Este profago tiene en su extremo 5' una integrasa, seguida de una acetiltransferasa. Presenta los genes estructurales y de ensamble de fago y un gen que codifica para la maquinaria que pincha la membrana bacteriana para luego inyectar el DNA viral. Tiene una terminasa que sirve para empacar en DNA viral en las nuevas cápsides, enzimas líticas (holinas), los genes del sistema de modificación y recombinación (metiltransferasa, el gen *ninG* y una recombinasa), una primasa y helicasa de fago, genes de regulación, genes homólogos al fago críptico Rac (involucrado en la regulación de genes formadores de bio-películas en las bacterias hospederas) (Liu, et al., 2015) y varias proteínas hipotéticas.

Profago 6 (Smup-6)

Este profago presenta una integrasa en su extremo 5', una ATPasa, genes que codifican para proteínas reguladoras, estructurales, de ensamble, de replicación y de empaque del DNA viral. Tiene un sistema de restricción de tipo I (metilasa). Además, tiene el gen de resistencia a metales pesados *terB* (a la telurita), tiene un gen que codifica para la toxina HipA que está

asociada a la persistencia en ambientes con antibióticos (Germain, et al., 2013) y además varias proteínas hipotéticas. Lo interesante de este profago es que se puede clasificar como un plásmido con genes de bacteriófago integrado en el cromosoma bacteriano o como una isla genómica/profago críptico (Mataseje, et al., 2014). Al hacer el BLASTN con toda la secuencia encontramos que este profago tiene naturaleza de mosaico ya que la región 5' tiene homología con un plásmido de *K. pneumoniae*, la región media con una isla genómica/profago críptico de *S. marcescens* y la región 3' con genes cromosomales de *E. coli*. Para mayor detalle ver la tabla 4.

Los profagos que se encuentran en la fase lisogénica y los fagos crípticos que por mutagénesis permanecen siempre en el genoma de su hospedero, son grandes contribuyentes de la adaptación bacteriana, ya que proveen de genes que aportan a la patogénesis como por ejemplo genes de tolerancia y resistencia a antibióticos, genes que ayudan a soportar diferentes tipos de estrés y genes que codifican diferentes toxinas (Wang, et al., 2016).

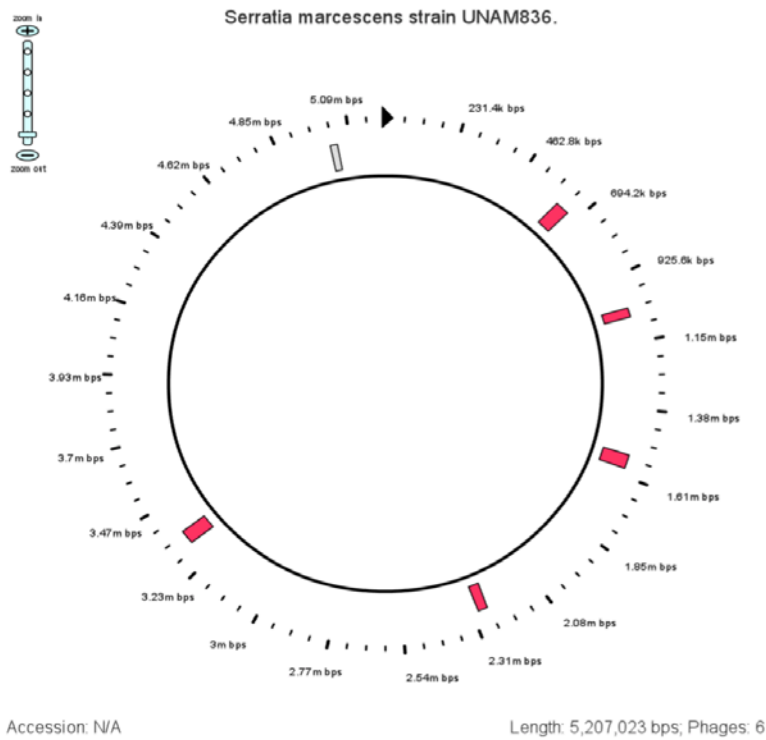


Figura 4. Identificación de profagos con el programa PHAST. Se identificaron 5 profagos (barras rojas) y un profago críptico (barra gris).

Tabla 3. Características generales de las islas genómicas de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

GEI	locus	tamaño pb	%GC	No. ORFs	sitio de inserción	cepa con > identidad	% id/ %cob	características generales
1	258573..269689	11117	56.62	11	tRNA-Thr	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>E. coli</i> ST2747 (5')	98/99 86/32	formación de biofilms
2	945889..985699	39811	47.45	31	no presenta	<i>S. marcescens</i> SM39 pequeños fragmen con <i>Erwinia</i> , <i>Klebsiella</i> <i>Salmonella</i>	99/16	biogénesis de cápsula antígeno O SST1
3	1212902..1231272	18371	58.03	20	5' tRNA-Ser 3'tRNA-Lys	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>P. aeruginosa</i> PA7	98/100 77/34	biogénesis de fimbrias, resist. a antibióticos y a metales pesados bomba de eflujo MexGHI
4	1748574..1782139	33565	57.58	25	4 orfs arriba hay un tRNA-Arg	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>P. fluorescens</i>	99/100 74/35	producción de bacteriocin citocromo C resist. a antimicrobianos
5	1923649..1970272	46624	63.69	30	no presenta	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>P. aeruginosa</i> PA7	99/100 74/48	sideróforo bombas de eflujo MexPQ y AcrEF de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i> resist. a fluoroquinolonas citocromo C
6	2698320..2708915	10955	61.94	14	5' tRNA-Asn	<i>S. marcescens</i> SM39 y con las demás <i>Serratias</i>	98/62	módulo toxina-antitoxina HigBA homólogo al de <i>E. coli</i>
7	2783996..2795293	11529	50.16	9	no presenta	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>K. oytoca</i> <i>E. cloacae</i> NCTC 9394	96/35 89/17 79/36	fosfolipasa putativa para la desintegración de cuerpos autofágicos vacuolares repeticiones de anquirina
8	2872573..2880252	8176	64.15	6	3' tRNA-Thr- tRNA-Ser	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>K. oytoca</i>	99/97 71/93	operón <i>rrt</i> proteínas de virulencia de fagos
9	3056751..3063157	6407	43.67	5	3' tRNA-Ala	<i>Serratia</i> sp. SBC1 <i>S. marcescens</i> SM39	83/99 72/97	proteínas para la biogénesis de fimbrias
10	3238292..3251723	14284	48.34	9	no presenta	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>K. michiganensis</i>	98/54 90/56	adhesión, Q-S virulencia
11	3564163..3586615	24547	57.59	18	hay una integrasa	<i>S. marcescens</i> B3R3 incompleta en otras <i>Serratias</i> no en SM39	88/99	bomba de eflujo EstABC, resistencia a macrólidos: eritromicina biogénesis de de fimbrias resistencia a xenobióticos
12	4000461..4018313	18629	64.64	1	6 genes río arriba hay un tRNA-Gly	<i>S. marcescens</i> SM39	99/100	sintetasa de péptidos no ribosomal
13	5070654..5081375	10722	66.65	9	no presenta	<i>S. marcescens</i> SM39 <i>P. aeruginosa</i> PA7	99/100 72/39	sideróforos de <i>P. aeruginosa</i>

Tabla 4. Características generales de los profagos de la cepa *S. marcescens* SmUNAM.

profago	locus	tamaño pb	% GC	No. ORFs	sitio de inserción	cepa con > identidad	% id/ % cob	características generales	referencia
1 no en Sm39	621390..659539	38150	50.84	41	integra en la región 3'	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816 KPPR <i>Klebsiella pneumoniae</i> XH209	82/35 81/38	genes de proteínas de fagos, no todas son de <i>Klebsiella</i> , algunos homólogos al fago e14 y al fago Qin	PUBMED 25291761 PUBMED 25540349
2 no en Sm39	1034774..1071218	36445	56.59	45	integra en la región 5'	<i>Yersinia enterocolitica</i> LC20 <i>Dickeya dadantii</i> 3937 <i>Serratia symbiotica</i> Sct	71/58 70/53 78/10	proteínas de fago los genes blastean con diferentes géneros de enterobacterias	PUBMED 21217001 PUBMED 24951564
3 sí en Sm39 translocado	1547867..1594521	46655	51.73	57	integra en la región 5'	<i>Serratia marcescens</i> SM39 <i>Yersinia enterocolitica</i> YE53/03 <i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	83/33 74/26 76/20	proteínas de fagos muchas hipotéticas transposón lsnB-1S1	PUBMED 25070509 PUBMED 22493190
4 parcial SM39 translocado invertido	2256301..2292608	36308	56.43	42	integra en la región 3'	<i>Serratia marcescens</i> SM39 <i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190 <i>Sodalis glossinidius</i> 'morsitans'	85/65 77/47 72/48	excisionasa lisozimas de fago la mayor parte son proteínas hipotéticas	PUBMED 25070509 PUBMED 22493190 PUBMED 16365377
5 no en SM39	3321627..3366386	44760	52.44	55	recombinasa en la región 3'	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 <i>Serratia plymuthica</i> 4Rx13 <i>Yersinia ruckeri</i>	73/35 84/24 71/41	proteínas de fagos, cápside, plato basal la mayor parte son proteínas hipotéticas	PUBMED 19897651 PUBMED 25635018
6 10% en SM39	5025236..5062664	37429	49.16	25	integra y tRNA-Leu en la región 5'	plásmido de diferentes cepas <i>K. pneumoniae</i> <i>C. freundii</i> 6221pb en centro hay una región de 4129 pb de un profago de <i>S. marcescens</i> N10-0408 en extremo 3' hay una región de <i>E. coli</i>	97/15 92/14 82/24	probable plásmido integrado con algunos genes de fago toxina HipA "prophage-like genomic island SmarGI1-1" o profago críptico	PUBMED 25267672 PUBMED 24659751 PUBMED 20098708

6.2.4. Genes de virulencia detectados en la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

Algunos de los genes de virulencia identificados en el cromosoma y en elementos móviles de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 son: los genes de motilidad de tipo swarming *rssAB* (Wei, et al., 2005) y 46 genes asociados a la motilidad flagelar que incluyen los genes estructurales (*fliA*, *fliC*, *fliD*, *fliE-R* y *flgA-L*), los de regulación de expresión del flagelo (*flhDC*) y los sistemas reguladores de dos componentes (*cheAB* y *cheZY*), así como los genes asociados a la energía que impulsa el movimiento del flagelo (*motAB*). Se encontraron 10 diferentes clusters de genes relacionados a la adhesión que codifican para fimbrias, entre ellos los genes *smf*. Se identificaron los genes relacionados al Quorum-Sensing *luxIR* y los genes asociados a la formación de bio-películas *oxyR*, *bsmAB* y un homólogo del gen *bsmB* localizado en la isla genómica 1. También se encontraron genes relacionados a los sistemas de secreción SST1, SST2, SST4, SST5 y SST6. Esta cepa carece de los genes del SST3. La cepa también presenta sideróforos y hemóforos, tiene más de 18 genes relacionados a sideróforos, entre ellos los genes

fepBDGC relacionados al transporte de hierro férrico y el receptor del sideróforo férrico dependiente de TonB, *fepA* (Miethke, et al., 2007). Estos genes también se han relacionado a las infecciones agudas en *Salmonella entérica* (Nagy, et al., 2013). También presenta el gen *hasB* que codifica para un hemóforo que se describió en *S. marcescens* y que capta hemoproteínas (Paquelin, et al., 2001). Fueron identificados varios genes que codifican para porinas asociadas a bombas de eflujo. El gen de la porina OmpE que forma parte de la bomba de eflujo MexPQ de *P. aeruginosa* fue identificado en la isla genómica 5, así como los genes de las porinas OmpA, OmpC, y OmpF. Otros genes relacionados a la virulencia que fueron detectados por el programa VFDB son: *shlAB* (biosíntesis de hemolisina), *phlAB* (fosfolipasa) y otros 18 genes homólogos a lipasas y fosfolipasas. También presentó genes que codifican para varias peptidasas entre ellas Clp y Lon y para 8 metaloproteasas no caracterizadas. No presenta el operón Pig que codifica para la prodigiosina. Presenta tres genes que codifican para quitinasas: *chiA*, *chiB* y *chic*, un gen homólogo al gen *aprA* que codifica para la serralisina, la catalasa *kataA*, el gen *degQ* que es un homólogo de gen *algW* de *P. aeruginosa* que codifica para una serina endopeptidasa y los genes *mgtA* y *mgtB* que codifican para transportadores de magnesio. El cluster de genes que codifican para la biosíntesis del antígeno O también está presente y consta de 10 genes. Los genes de la pioverdina *pvcAB* de *P. aeruginosa* se encontraron en el genoma de *S. marcescens* SmUNAM836 interrumpidos por una secuencia de inserción IS1. El hecho de que se encuentren interrumpidos los hace genes no funcionales. En la isla genómica 12 también se localizaron genes homólogos de *P. aeruginosa*, los genes *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* para la síntesis de pioverdina con un 38% de identidad. Estos genes están ubicados en módulos de sintetasa de péptidos no ribosómicos. El gen *msgA* que codifica para la proteína de virulencia MsgA y que se ha relacionado a la sobrevivencia de las bacterias en macrófagos, se localizó en la isla genómica 8 (Gunn, et al., 1995; Lee, et al., 2013). Para mayor detalle ver la tabla 5.

Los genes de virulencia de *P. aeruginosa* detectados en un principio por PCR no fueron hallados en el cromosoma cuando se analizó la secuencia completa del cromosoma en la cepa de *Serratia marcescens* SmUNAM836 confirmando que la cepa de *Serratia marcescens* SmUNAM836 se hallaba estrechamente unida a una cepa de *P. aeruginosa*, de forma que los primeros resultados fueron producto de la amplificación de genes presentes en *P. aeruginosa* y no de *Serratia marcescens* SmUNAM836, como se había pensado.

Tabla 5. Factores de virulencia de la cepa *Serratia marcescens* SrrLNA1836

GENES	FUNCIÓN	LOCUS	HGT	REFERENCIAS
Motilidad de tipo Swarming				
<i>rssAB</i>	sistema de transducción de señales	3642984		
Motilidad de tipo Twitching				
<i>pilT</i>	retracción del pilus	3760671 c		
Flagelo: Motilidad tipo Swimming, Swarming, Colonización y Formación de Bio-Películas				
operón <i>flhCAZY</i>	proteínas de estructural del filamento y biosíntesis del factor sigma	2460395..2465138 c		
operón <i>flhDST</i>	proteínas de la envoltura del tubo	2465420..2472956		
<i>flhE</i>	proteínas del codo	2472956 c		
operón <i>flhF-R</i>	proteínas de los anillos MS y C y SST3	2473585..2484334		
operón <i>flgB-L</i>	proteínas del cuerpo basal	2485979..2496055 c		
<i>flgAMN</i>	proteínas del anillo P y factor anti-sigma	2496210..2496869		
<i>flhBAE</i>	proteína flagelar de exportación	2498689..2502315 c		
<i>cheRBYZ</i>	proteínas de quimiotaxis	2502481..2505507 c		
<i>tar-cheAW</i>	proteína de quimiotaxis	2507280..2511700 c		
<i>motAB</i>	proteína flagelar de motor	2511700..2514380 c		
<i>flhDC</i>	regulador de síntesis del flagelo	2513799..2514380 c		
Quorum Sensing y Formación de Bio-Películas				
<i>bsmB</i>	activador de la agregación celular		263110 c (GEI 1)	
<i>luxR</i>	regulador transcripcional		3242040 (GEI 10)	
<i>bsmA</i>	regulador del tamaño de los agregados	3604618		
<i>luxR'</i>	regulador transcripcional	4333442		
<i>oxyR</i>	regulador transcripcional	4362068 c		
<i>luxR''</i>	regulador transcripcional	5014767		
<i>luxI</i>	homoserina-lactona sintetasa	5015484 c		
Sistemas de Secreción				
SST1				
<i>lipBCD</i>	secreción de lipasa asociada a la síntesis de la capa S		969876..972909 (GEI 2)	
SST2				
<i>gspE</i>	proteína de secreción E del sistema de secreción SST2	109029 c		Patrick, et al., 2010
operón <i>gspC-O</i>	proteínas de secreción del sistema SST2	401189..411561		
SST4				
<i>Trb1/VirB-6</i>	proteína de conjugación		24370 (plásmido)	
<i>CpoF</i>	proteína de ensamblaje de pilus		18104 (plásmido)	
SST5				
<i>shlBA</i>	secreción de hemolisina	4072439..4078990		
<i>cdiABC</i>	secreción de hemaglutinina	2122044..2137183 c		
SST6				
<i>tss1/vgrG</i>	proteína de la lanceta	2520256		
<i>tss1</i>	proteínas del complejo de membrana	2529034		
<i>tssK</i>	proteínas del complejo del plato basal	2529605		
<i>tssL</i>	proteínas del complejo de membrana	2530973		
<i>tssM</i>	proteínas del complejo de membrana	2532175		
<i>tagF</i>	represor post-traducciona	2535829		
<i>tssA</i>	proteína de la tapa	2536572		
<i>tssB</i>	proteínas de la envoltura del tubo	2537725		
<i>tssC</i>	proteínas de la envoltura del tubo	2538265		
<i>tssD</i>	proteínas de síntesis del tubo	2541008		
<i>fha</i>	regulador post-traducciona	2543506		
<i>pppA</i>	regulador post-traducciona	2545251		
<i>tagI</i>	proteína accesoria para el funcionamiento de <i>tssH</i>	2547055		
<i>tssE</i>	proteínas del complejo del plato basal	2547879		
<i>tssF</i>	proteínas del complejo del plato basal	2548459		
<i>tssG</i>	proteínas del complejo del plato basal	2550342		
<i>tssH/cipV</i>	ATPasa para la desintegración de la envoltura	2551469		
<i>ppkA</i>	regulador post-traducciona	2554173		
<i>tss1/vgrG</i>	proteína de la lanceta	2555749		
Porinas				
<i>ompF</i>	resistencia a β-lactámicos cuando no se expresa	1167695 c		
<i>ompA</i>	adherencia y formación de bio-películas	1197749 c		
<i>oprM</i>	porina de la bomba de eflujo MexAB		1951224 c (GEI 5) 42% id. <i>P. aeruginosa</i>	
<i>ompE</i>	porina de la bomba de eflujo MexPQ		1945473 (GEI 5) 70% id. <i>P. aeruginosa</i>	
<i>ompW</i>	resistencia contra fagocitosis	2182535		Wu, et al. 2013
<i>ompC</i>	resistencia a cefalosporinas y tetraciclina	2882964 c		
<i>ompR</i>	regulador de los genes <i>ompC</i> y <i>ompF</i>	4202263 c		
Sideróforos, captación de hierro				
<i>iutA</i>	receptor del sideróforo férrico aerobactin	221639 c		
<i>fur</i>	regulador de sideróforos	542017 c		
<i>cbsF</i>	crisobactin sintetasa		1923649 c (GEI 5) 71% id. <i>Dickeya</i> spp.	
<i>fes</i>	esterasa		1932466 c (GEI 5)	
<i>fct</i>	transportador del sideróforo crisobactin		1933974 (GEI 5)	
<i>fepBDGC</i>	síntesis del sideróforo enterobactin	3066694..3070832		
<i>fes'</i>	esterasa del sideróforo enterobactin	3070870 c		
<i>fepA</i>	transportador del sideróforo	3072431		
<i>iucD</i>	receptor del sideróforo hidroxamato aerobactin	3787850		
<i>fepA'</i>	transportador del sideróforo	4834432 c		
<i>fes''</i>	esterasa del sideróforo enterobactin	4837071		
<i>entF/SCEB</i>	síntesis del sideróforo enterobactin	4838592..4847886		
<i>fptA</i>	receptor de pioquelina		5075599 (GEI 13) 72% id. <i>P. aeruginosa</i>	
Hemóforos, captación de grupos heme				
<i>hasS</i>	factores sigma/anti-sigma	307276..308806		Cescau, et al., 2007
operón <i>hasRADEB</i>:				
<i>hasR</i>	receptor de la membrana externa	308963		
<i>hasA</i>	hemóforo	311741		
<i>hasDE</i>	transportadores del grupo heme	312413..315492		
<i>hasB</i>	recepción del grupo heme, homólogo de <i>tonB</i>	315495		Paquelin, et al., 2001
Fimbrias, adhesión a superficies bióticas y abióticas				
<i>pilB/hojC/ppdB</i>	biogénesis del pilus tipo IV	107833..110914 c		
<i>matBC</i>	biosíntesis de la fimbria de tipo "Mat"	862458..863791		
operón homólogo a <i>fim</i>	biosíntesis de fimbrias de tipo I	883419..888385		
operón homólogo a <i>fim</i>	biosíntesis de fimbrias de tipo I	1009900..1018333 c		
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas		1216003..1220928 (GEI 3)	
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas	1391570..1397589 c		
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas	1499798..1505043 c		
operón <i>smjEFG</i>	biosíntesis de fimbrias (adhesión y colonización del tracto urinario)	2650613..2658294 c		Mizunoe, et al. 1991
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas		3058289..3063157 (GEI 9)	
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas		3570343..3575948 c (GEI 11)	
operón <i>smjEFG</i>	biosíntesis de fimbrias (adhesión y colonización del tracto urinario)	3775866..3784311 c		
operón homólogo a <i>hojMNOPQ</i>	fimbria de tipo IV	4186772..4190227 c		
operón no caracterizado	biosíntesis de fimbrias no caracterizadas	4268377..4274992		
LPS y Cápsula				
operón <i>wza-wzb-wzc</i>	biosíntesis de la cápsula		945889..949568 (GEI 2)	
<i>kdsB/legI/lsg</i>	biosíntesis de LPS		949657..953829 (GEI 2)	
<i>rjBU</i>	biosíntesis del antígeno O		957930 (GEI 2)	
<i>siaA</i>	biosíntesis de la capa-S		966126 c (GEI 2)	
cluster del antígeno O (<i>wzm, wzt</i>)	biosíntesis del antígeno O (sin homólogos)		974796..987252 (GEI 2)	
operón <i>waa</i>	biosíntesis del "core" del LPS	4416242..4431466		
Ploverdinas				
<i>pvcA-insB-pvcB</i>	biosíntesis de ploverdina		25356..28058 en una sec. de inserción 85% de id. con <i>P. aeruginosa</i>	
Prodiosina				
operón <i>plg</i>	biosíntesis de prodiosina	no tiene los genes		
Reguladores Globales de Virulencia				
<i>hha</i>	modulador de la expresión de hemolisina junto con H-NS	414472 c		
<i>phoPQ</i>	sistema de regulación de dos componentes (virulencia)	1439092..1441226 c		
<i>marR</i>	regulación negativa de resistencia a múltiples antibióticos y tóxicos		1772643 (GEI 4)	
<i>hns</i>	regulador H-NS, silenciamiento de genes xenogénicos	2218267		Picker, et al., 2016
<i>rCSA</i>	proteína activadora de la formación de la cápsula	2596569		
<i>rCSDBC</i>	regulador de motilidad, síntesis de cápsula y formación de biopelículas	2886428..2892702		
<i>bacSR</i>	sistema de regulación de dos componentes (genes de resistencia)	3209787..3211885		
<i>rCSF</i>	regulador de motilidad, síntesis de cápsula y formación de biopelículas	3451679		
<i>rCSB', rCSB'</i>	regulador transcripcional junto con <i>rCS</i> y <i>rCSD</i>		3568868..3570292 c (GEI 11)	
<i>crp</i>	modulador de la transcripción de genes flagelares	4158714		
Otras Proteínas de Virulencia				
<i>lan</i>	proteasa ATP-dependiente	379481		
<i>chiC</i>	quitinasa	526816 c		
<i>ccdAB</i>	modulo toxina-antitoxina para el mantenimiento del plásmido		9966..10537 c (plásmido)	
<i>cipP'</i>	proteasa ATP-dependiente	1390060		
gen no especificado	biosíntesis de bacteriocin (péptido antibacteriano)		1753164 c (GEI 4)	
<i>chiA'</i>	quitinasa	2237775		
<i>mgfB</i>	transportador de magnesio	2584956 c		
<i>higBA</i>	modulo toxina-antitoxina para la regulación de la virulencia		2704895..2705552 c (GEI 6)	Lobato-Márquez, et al., 2016
gen no especificado	fosfolipasa para la desintegración de cuerpos autofágicos		2783996 (GEI 7)	
<i>hlyF</i>	hemolisina F	2809184 c		
<i>ttrACB</i>	tetratioato reductasa para la colonización de ambientes anaeróbicos		2872573..2877396 c (GEI 8)	
<i>ttrSR</i>	sistema de regulación de dos componentes, anaerobiosis		2877584..2879918 (GEI 8)	
<i>msgA</i>	superficie dentro de macrófagos		2880010 (GEI 8)	Lee, et al., 2013
<i>katA</i>	catalasa/peroxidasa	2904912		
<i>chiB</i>	quitinasa	3120202		
<i>phlBA</i>	fosfolipasa (secretada por el sistema flagelar)	3381613..3383323 c		Anderson, et al. 2017
<i>hlyIII</i>	hemolisina III	3622601 c		
<i>cipPX</i>	proteasa ATP-dependiente	377249..379287		
<i>degQ</i>	proteasa periplásmica homóloga a <i>algW</i>	3928781		
<i>chiA</i>	quitinasa	4626479		
<i>oprA</i>	precursor de la serralsina (metaloproteasa)	4713283		
<i>mgfA</i>	transportador de magnesio	4988551		
<i>hipA</i>	toxina asociada a la persistencia en ambientes con antibióticos		5051390 prophago	Germain, et al., 2013

7. Resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos puede darse mediante alguno de los siguientes mecanismos: a) reducción del paso del antibiótico a través de la membrana externa hacia el interior de la célula, previniendo de este modo el acceso al blanco, como es el caso de los antibióticos carbapenémicos al modificarse las porinas de la membrana (Kaczmarek, et al., 2006), b) alteración de los blancos del antibiótico mediante enzimas modificadoras, c) hidrólisis o inactivación de los antibióticos y/o d) aumento en el transporte de antibióticos hacia el exterior de la célula bacteriana mediante las bombas de eflujo (Shaikh et al., 2015; Munita, et al., 2016). Frecuentemente deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevida bacteriana. La modulación de la resistencia a ciertos antibióticos depende también de la presencia y activación de los genes de regulación, de mutaciones en genes específicos, de la diferencia intrínseca en la estructura de la membrana externa y de la adquisición de genes de resistencia por vía de la transferencia horizontal de genes (Blair, et al., 2015). Esta complejidad en los mecanismos de resistencia es la razón por la cual una bacteria que presenta un genotipo resistente (presencia de genes de resistencia) no necesariamente siempre va a producir un fenotipo resistente. Un ejemplo de este hecho se ilustra con el gen *aac(6')-Ic* de las cepas de *S. marcescens* (Shaw, et al., 1992). Un análisis de hibridación DNA-DNA demostró que todas las cepas de *S. marcescens* tienen este gen en su cromosoma independientemente del perfil de resistencia que exprese cada cepa, algunas de ellas resultaron susceptibles a los aminoglucósidos (Shaw, et al., 1993).

7.1. Identificación de los genes de resistencia a antimicrobianos en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 y su correlación con su perfil fenotípico de resistencia

El perfil de resistencia a antimicrobianos de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 está esquematizado en la tabla 6. La cepa fue probada con el esquema de antibióticos para enterobacterias que propone el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro para Control y Prevención de Enfermedades (CDC). De acuerdo con la definición de resistencia a antimicrobianos y a la familia de antibióticos a los que fue sometida la cepa, se le puede considerar como una cepa multi-drogo resistente (Magiorakos, et al., 2012). Debido a que no contamos con las cepas del resto de las especies de *Serratia* que se usaron en este estudio, no pudimos realizar su perfil fenotípico de resistencia.

Con base a los genes de resistencia que se identificaron en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 se hizo una correlación con su perfil fenotípico de resistencia (tabla 7).

Tabla 6. Perfil de resistencia a antimicrobianos y determinantes genéticos responsables de la resistencia de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836.

Agentes Antimicrobianos	MIC (µg/ml)	R/I/S	Genes de Resistencia					
			en el cromosoma				en el plásmido	
			gen	locus	gen	locus	gen	locus
β-lactámicos								
Penicilinas								
Carbenicilina	4-16	R	<i>ampC</i>	1712814..1713950			<i>blaTEM-1</i>	687..1547
Ticarcilina	4-16	R	<i>ampC</i>	-			<i>blaTEM-1</i>	-
Piperacilina	1-4	R	<i>ampC</i>	-			<i>blaTEM-1</i>	-
Ticarcilina/Clavulanato	4/2-16/2	R	<i>ampC</i>	-			<i>blaTEM-1</i>	-
Amoxicilina/Clavulanato	2/1-8/4	R	<i>ampC</i>	-			<i>blaTEM-1</i>	-
Piperacilina/Tazobactam	1/4-4/4	R	<i>ampC</i>	-			<i>blaTEM-1</i>	-
Cefalosporinas								
Ceftazidima (3era gen)	0.06-0.5	S*	<i>ampC s</i>	-				
Ceftriaxona (3era gen)	0.03-0.12	R	<i>ampC s</i>	-				
Cefotaxima (3era gen)	0.03-0.12	R	<i>ampC s</i>	-				
Cefepima (4ta gen)	0.015-0.12	R	<i>ampC s</i>	-				
Carbapenémicos								
Imipenem	0.06-0.25	I					<i>bla-IMP</i>	ausente
Meropenem	0.008-0.06	S					<i>bla-IMP</i>	ausente
Monobactámicos								
Aztreonam	0.06-0.25	R	<i>ampC s</i>	1712814..1713950				
Aminoglucósidos								
Amikacina	0.5-4	S	<i>acc(6)-ic</i>	3875228..3875668				
Tobramicina	0.25-1	R	<i>acc(6)-ic</i>	-				
Gentamicina	0.25-1	S	<i>aac(3)</i>	ausente				
Polipéptidos								
Polimixina B	0.25-2	R	<i>arnBCADTEF</i>	1605949..1613345				
Quinolonas								
Ciprofloxacina	0.004-0.015	R	<i>gyrAc</i>	(+)2892866..2895508	<i>qnrB31</i>	1464582..1465226		
Lomefloxacina	0.03-0.12	R	<i>gyrAc</i>	-	<i>qnrB31</i>	-		
Norfloxacina	0.03-0.12	R	<i>gyrAc</i>	-	<i>qnrB31</i>	-		
Levofloxacina	0.008-0.06	R	<i>gyrAc</i>	-	<i>qnrB31</i>	-		
Ácido nalidíxico	1-4	R	<i>gyrAc</i>	-	<i>qnrB31</i>	-		
Otros								
Cloranfenicol	2-8	S	<i>cat</i>	2976133..2976762				
Tetraciclina	0.5-2	I	<i>tetA</i>	ausente				
Trimetoprim/Sulfametoxazole	<0.5-9.5	S					<i>dfrA5/sul1</i>	ausente

R: resistente, I: intermedio, S: sensible

ampC s: sobre expresión del gen *ampC*

gyrAc: mutación en el gen *gyrA*

7.2. Resistencia antimicrobiana de la cepa *Serratia marcescens* SmUNAM836

7.2.1. Genes de resistencia intrínseca

Un gran número de genes relacionados a la resistencia a antimicrobianos están codificados en el cromosoma de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836, por lo que se clasifican como genes de resistencia intrínseca. Entre ellos se encuentra el gen *ampC* que confiere

resistencia a los antibióticos β -lactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas y los monobactámicos. El gen *ampC*, cuando es sobre-expresado es responsable de la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación como la ceftriaxona y cefotaxima (Paterson, et al., 2005), a la cefepima que es una cefalosporina de 4ta generación y al aztreonam, un monobactámico. En un estudio hecho por Mammeri y colaboradores (Mammeri, et al., 2004) se muestra que la proteína AmpC puede conferir resistencia a la cefepima si ocurre una delección de 12 nucleótidos en el gen *ampC* resultando en la pérdida de los aminoácidos MNGT en las posiciones 233 a la 236 de la proteína. La secuencia del gen *ampC* de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 se alineó con la secuencia reportada por Mammeri et al. y se pudo verificar que esta cepa no presenta la delección citada, por lo que el fenotipo de resistencia a la cefepima se tiene que deber a una alteración de las porinas OmpC y OmpF (Simonet, et al., 2000, Lou, et al., 2011), o a otro mecanismo asociado a la resistencia a este antibiótico como podría ser una sobre-expresión de los sistemas de eflujo o del gen *ampC*. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* presenta un fenotipo resistente a la cefepima y susceptible a la ceftazidima. Este fenotipo se atribuye a la sobreexpresión del sistema de eflujo MexXY-OprM (una bomba de eflujo de la familia RND, homóloga a las bombas SdeXY de *Serratia* y AcrAB de *E. coli*) (Hocquet, et al., 2006). La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 presentó el mismo fenotipo por lo que pensamos que se le podría atribuir a este mismo mecanismo de sobreexpresión de la bomba SdeXY. El gen *ampC* se encuentra en el cromosoma junto con sus genes de regulación *ampD*, *ampE*, *ampG* y *ampR* (MacDougall, 2011).

En el cromosoma de esta cepa también se encuentran dos genes responsables de la resistencia a aminoglucósidos, el gen *aac(6')-Ic* (aminoglucósido acetiltransferasa) y el gen *aph(3'')* (aminoglucósido fosfotransferasa). La enzima AAC(6')-ic confiere resistencia a la tobramicina y a la amikacina (Shaw, et al., 1992) y APH(3'') a la estreptomycin (no probada en este estudio). El gen *aac(3)-Ia* que codifica para la acetiltransferasa AAC(3) y que confiere resistencia a la gentamicina está ausente del cromosoma de la cepa SmUNAM836, esto explicaría su fenotipo susceptible a este antibiótico (Schwocho, et al., 1995).

El género *Serratia*, a diferencia de *Pseudomonas aeruginosa*, es intrínsecamente resistente a la polimixina B. Este fenotipo resistente de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 se puede explicar por la presencia del operón *arnBCADTEF* y los sistemas de dos componentes *pmrAB/phoPQ*. La activación de estos sistemas de dos componentes se pone en marcha por

estímulos ambientales que resultan en una sobreexpresión de los genes modificadores de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa bacteriana haciendo que se produzca la resistencia a este antibiótico y a la colistina (no probada en este estudio) (Lin, et al., 2014; Olaitan, et al., 2014).

La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 es resistente a las 4 fluoroquinolonas de segunda generación probadas en este estudio (ciprofloxacina, levofloxacina, lomefloxacina y norfloxacina) y al ácido nalidíxico. Este hecho no sorprende debido a que todas tienen el mismo mecanismo de acción, por lo que, si una bacteria es resistente a un tipo de quinolona, lo será para todas las demás (Webber, et al., 2001). La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 presenta en su cromosoma el gen *qnr* que codifica para la proteína de resistencia a las quinolonas Qnr. Este gen únicamente se encuentra en el cromosoma de los miembros del género *Serratia* pudiendo ser la fuente de los genes *qnr* plasmídicos adquiridos por transferencia horizontal en bacterias de otros géneros (Velasco, et al., 2010).

Esta cepa también tiene en su cromosoma los genes *bacA*, *hslJ* y *fosA* que confieren resistencia los antibióticos bacitracina, novobiocina y fosfomicina respectivamente. Estos antibióticos no fueron probados en este estudio. Para mayor detalle ver la tabla 1-S.

La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 también resultó ser susceptible al cloranfenicol a pesar de que en su cromosoma se encuentra el gen *cat* que codifica para la enzima modificadora Cat (cloranfenicol acetiltransferasa) (Schwarz, et al., 2004). Una posible razón a este hecho podría ser que las colonias bacterianas creciendo *in vitro* expresaran bajos niveles de acetil coenzima A, cuyo grupo acetilo es lo que se transfiere a la molécula de cloranfenicol para inactivarla (Potrykus, et al., 2001).

7.2.2. Genes asociados a bombas de eflujo

Las bombas de eflujo multidrogas constituyen uno de los mecanismos de resistencia intrínseca más importantes en procariontes. La expulsión activa de antimicrobianos está mediada por los transportadores de membrana, siendo sinérgico con otros mecanismos como la alteración en la permeabilidad de membrana. Algunos sistemas de eflujo se expresan constitutivamente, mientras que otros son regulados por genes reguladores y dependen de estímulos externos. Se identificaron 57 genes relacionados a bombas de eflujo en la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 que incluyen los genes que codifican a las proteínas transportadoras, a las porinas y a las

proteínas reguladoras (tablas 8 y 9). Algunos de estos genes tienen varias copias en el cromosoma. Se identificaron 3 bombas de eflujo pertenecientes a la familia MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion): las bombas MdtK y su alelo MdtK' y la bomba DinF que confieren resistencia a las fluoroquinolonas y al ácido nalidíxico respectivamente (Brown, et al., 2007), además, 3 bombas de eflujo de la familia SMR (Small Multidrug Resistance): la bomba SsmE que es homóloga a la bomba QacH de *Vibrio cholera* y que confiere resistencia al bromuro de etidio (Minato, et al., 2008), la bomba SugE que confiere resistencia a los compuestos cuaternarios de amonio (antisépticos efectivos contra infecciones bacterianas) (Chung, et al., 2002) y la bomba MdtIJ que transporta espermidina. La cepa presenta 11 bombas de eflujo de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily), que pueden ser monoméricas o de múltiples componentes: la bomba MdtG que pertenece al regulón *marA-soxS-rob* y que confiere resistencia a la fosfomicina y al desoxicolato (Fàbrega, et al., 2010) (no probados en este estudio). El gen *mdtG* tiene dos copias en el cromosoma de *S. marcescens* SmUNAM836. Las proteínas de eflujo MdtH y MdtD que confieren resistencia a las fluoroquinolonas enoxacina y norfloxacin (Nishino, et al., 2001) y al peróxido de hidrógeno y al óxido nítrico (Frawley, et al., 2013) respectivamente, también fueron identificadas en el cromosoma. Fue localizado en el cromosoma el gen *bcr* que codifica para la proteína de eflujo Bcr y que confiere resistencia a la bacitracina (Bernard, et al., 2005) (no probada en este estudio). Originalmente identificada en *E. coli*, la bomba de eflujo MdfA está presente en el cromosoma de *S. marcescens* SmUNAM836 y confiere resistencia a un gran número de antibióticos hidrofóbicos, entre ellos el cloranfenicol (Heng, et al., 2015). Esta cepa es sensible a este antibiótico por lo que suponemos que esta bomba de eflujo no se expresó durante los ensayos con antimicrobianos. La cepa presenta un grado intermedio de susceptibilidad a la tetraciclina a pesar de no tener en su cromosoma el gen *tetA* que codifica para la bomba de eflujo TetA (Aldema, et al., 1996), lo que nos haría suponer que la resistencia moderada sea dada por la activación de otras bombas de eflujo, por ejemplo, por la bomba SmdAB (Matsuo, et al., 2008) (ver más adelante). Se identificó también una bomba de eflujo perteneciente al género *Serratia*, la bomba SmfY que confiere resistencia a la norfloxacin, la acriflavina y al bromuro de etidio (Shahcheraghi, et al., 2007) (estos dos últimos no fueron probados en este estudio). Esta cepa es resistente a la norfloxacin y a todas las demás quinolonas probadas en este estudio. La presencia de esta bomba podría explicar esta resistencia. La bomba EmrAB presenta dos copias en el cromosoma de esta cepa y también presenta el gen

tolC que codifica para la proteína de membrana externa TolC y el gen *emrR* que codifica para la proteína reguladora EmrR. El sistema de eflujo tripartita EmrAB-TolC confiere resistencia al ácido nalidíxico, quinolona a la que es resistente la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 y a la tiolactomicina (Furukawa, et al., 1993; Lomovskaya, et al., 1995) un antibiótico usado contra la tuberculosis (no probado en este estudio). También está presente en el cromosoma la bomba EmrD que expulsa diversos compuestos anfipáticos como los péptidos antimicrobianos y la bomba Fsr, que es homóloga a la bomba RosA que confiere resistencia a la fosmidomicina (Nishino, et al., 2001) (no probada en este estudio).

Otro tipo de bombas de eflujo muy abundantes en enterobacterias son las bombas tripartitas de la familia RND (Resistance Nodulation and cell Division). La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 presenta 8 bombas de esta familia, 6 de resistencia intrínseca y 2 de resistencia adquirida las cuales se van a discutir en el siguiente inciso. La bomba de eflujo AcrD, de *E. coli* fue identificada en el cromosoma y presenta un alelo en otro locus además de sus dos genes reguladores *baeRS* (Nishino, et al., 2005). Esta bomba confiere resistencia a los aminoglucósidos tobramicina, amikacina, gentamicina y neomicina (Rosenberg, et al., 2000) (esta última no fue probada en este estudio). Esta cepa, a pesar de tener dos genes *acrD* es susceptible a la gentamicina y a la amikacina (tabla 6). Tres bombas de eflujo específicas del género *Serratia* también fueron identificadas en el cromosoma de *S. marcescens* SmUNAM836, la bomba SdeAB (Kumar, et al., 2005) que confiere resistencia a todas las fluoroquinolonas, la bomba SdeCDE, homóloga a la bomba de eflujo de *E. coli* MdtABC y que confiere resistencia a la novobiocina (Begic, et al., 2008) (no probada en este estudio) y la bomba SdeXY, homóloga a las bombas MexXY/AcrAB de *P. aeruginosa* y *E. coli* respectivamente, que confieren resistencia a varios antibióticos entre ellos a eritromicina, tetraciclina, norfloxacin, acriflavina, bromuro de etidio y ampicilina (Chen, et al., 2003). Esta cepa presenta resistencia contra norfloxacin y ampicilina, el resto de los compuestos antimicrobianos no fueron probados en este estudio.

Seis bombas de eflujo de la familia ABC (ATP-Binding Cassette) fueron identificadas en el cromosoma de esta cepa, la bomba heterodimérica del género *Serratia* SmdAB que confiere resistencia a la norflaxina y a la tetraciclina (Matsuo, et al., 2008), la bomba MsbA que confiere resistencia a la eritromicina, tetraciclina y doxorubicina y expulsa compuestos fosfolípidos (Reyes, et al., 2006) y las bombas tripartitas MacAB-TolC y EtsABC que expulsan macrolidos y

factores de virulencia polipeptídicos. Los transportadores MacAB y EtsAB presentan una alta identidad entre ellos y ambos fueron descritos en *E. coli* (Johnson, et al., 2006; Lu, et al., 2012; Fitzpatrick, et al., 2017). Los genes *etsABC* presentan 3 copias en diferentes *loci* del cromosoma.

En la tabla 7 se encuentran los detalles de los genes pertenecientes a las 5 familias de bombas de eflujo identificadas en el genoma de esta cepa.

Tabla 7. Bombas de eflujo identificadas en el genoma de *S. marcescens* SmUNAM836.

Familia	Genes	Porina	Genes Reguladores	SmUNAM836 locus	Homólogos	Elemento Móvil
MATE	<i>mdtK</i> <i>mdtK'</i> <i>dinF</i>			1646328..1647704 c 2659405..2660838 c 4044415..4045752 c		
SMR	<i>mdtIJ</i> <i>ssmE</i> <i>sugE</i>			2309993..2310680 c 2071501..2071821 c 4864138..4864455	<i>qacH</i>	
MFS	<i>bcr</i> <i>mdfA</i> <i>mdtD</i> <i>mdtG</i> <i>mdtG'</i> <i>mdtH</i> <i>smfY</i> <i>emrAB</i> <i>emrA'B'</i> <i>emrD</i> <i>fsr</i>	<i>tolC</i> <i>tolC</i>	<i>emrR</i> <i>emrR</i>	2858424..2859620 c 4591929..4593284 c 3208360..3209790 1295507..1296745 c 1831674..1832873 c 2344979..2346184 2200397..2201869 3431376..3434104 4604091..4605668 4393084..4394268 c 441372..442592 c	<i>rosA</i>	
RND	<i>acrD</i> <i>acrD'</i> <i>acrEF</i> <i>sdeAB</i> <i>sdeDE</i> <i>sdeXY</i> <i>mexGHI</i> <i>mexPQ</i>	<i>oprM</i> <i>tolC</i> <i>sdeC</i> <i>tolC</i> <i>opmD</i> (no se encontró) <i>opmE</i>	<i>baeRS</i> <i>sdeR</i>	3132790..3135927 1995580..1998684 c 1952284..1956565 c 1338630..1342985 c 3200900-3208349 419185..423536 c 1222940..1224461 1942309..1946951	<i>mexAB</i> <i>oqxAB</i> <i>mdtABC</i> <i>mexXY/AcrAB</i>	Isla Genómica 5 Isla Genómica 3 Isla Genómica 5
ABC	<i>msbA</i> <i>smdAB</i> <i>macAB</i> <i>etsAB</i> <i>etsAB'</i> <i>etsAB''</i>	<i>tolC</i> <i>etsC</i> <i>etsC'</i> <i>etsC''</i>		1145593..1147341 390751..394297 1105515..1108573 1270900..1275395 c 4954701..4957944 3579042..3585651 c	<i>mdlAB</i>	 Isla Genómica 11

7.2.3. Resistencia adquirida por HGT y mutaciones

Los genes de resistencia adquirida generalmente se localizan en elementos móviles como plásmidos, transposones, fagos o islas genómicas y están involucrados en la dispersión de determinantes antimicrobianos entre bacterias. También como resistencia adquirida se van a incluir en este estudio los genes del metabolismo básico, que al sufrir mutaciones específicas producen proteínas capaces de conferir resistencia contra ciertos antibióticos.

La mayor parte de los genes de resistencia a los antibióticos β -lactámicos son genes de resistencia adquirida que pertenecen a las clases designadas por Ambler en 1980, quien propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y a la secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designadas como A, B, C y D. Bush y Jacoby revisaron esta clasificación y propusieron actualizarla con base a la actividad enzimática o afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y a su sensibilidad a la acción inhibitoria por el ácido clavulánico. Tanto la clasificación de Bush y Jacoby (Bush, et al., 2010) como la de Ambler están correlacionadas (Ambler, 1980). En este estudio se usará la clasificación de Ambler. Uno de los genes asociados a la resistencia a β -lactámicos es el gen *bla*_{TEM-1}, que está presente en el plásmido pSmUNAM836 de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836. Este gen codifica para una β -lactamasa de amplio espectro y confiere resistencia a todas las penicilinas que incluyen la ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina y piperacilina, y no es inhibido por los inhibidores de las β -lactamasas como el ácido clavulánico o el tazobactam (Van Hoek, et al., 2011). Esto explicaría la resistencia de esta cepa a todas las penicilinas y a las penicilinas combinadas con clavulanato o tazobactam.

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos está asociada con el gen *bla*_{KPC-2}, que codifica para una carbapenemasa y el gen *bla*_{VIM} que codifica para una metalo- β -lactamasa. Ninguno de estos genes está presente en el genoma de la cepa SmUNAM836 y tampoco presenta ningún otro gen que codifique para metalo- β -lactamasas lo que explicaría su susceptibilidad al meropenem y su susceptibilidad intermedia al imipenem. Existen otros mecanismos que confieren resistencia a los antibióticos carbapenémicos tales como la disminución de la producción de canales de porinas, el aumento del eflujo o la combinación de ambos mecanismos (Jacoby, 2009), pero no fueron estudiados en esta cepa.

La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 es susceptible al trimetoprim/sulfametoxazol, un antibiótico compuesto de la familia de las sulfamidas. Su genoma no presenta ninguno de los

genes asociados con este antibiótico, el gen *dfrA5*, que confiere resistencia al trimetoprim está ausente, lo mismo que el gen *sul* que confiere resistencia a las sulfamidas. La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 no presenta otros genes de resistencia adquirida en su plásmido, pero sí se identificaron 4 bombas de eflujo transferidas horizontalmente en islas genómicas. Estos genes presentaron homología con los genes de las bombas de *P. aeruginosa* y *E. coli* y fueron identificadas en islas genómicas en el cromosoma de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836. Tres de los sistemas de eflujo multidrogas pertenecen a la familia RND: la bomba MexPQ, la bomba MexGHI y la bomba AcrEF con una identidad del 84% y 82% con *P. aeruginosa* PA7 y con una identidad del 58% con *E. coli* respectivamente. Las bombas MexPQ y MexGHI confieren resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas y a norfloxacin y acriflavina respectivamente (Aendekerk, et al., 2005; Mima, et al., 2005). La bomba de eflujo AcrEF confiere resistencia a la ampicilina, ciprofloxacina y tetraciclina (Lau, et al., 2005). También se indentificó en una isla genómica uno de los alelos de la bomba de eflujo EtsABC de la familia ABC, homóloga de *E. coli* y que confiere resistencia a macrólidos.

La resistencia también puede aparecer debido a mutaciones puntuales en algunos genes y que resultan en sustituciones de aminoácidos que afectan la conformación de la proteína y su función. Se hizo un escrutinio de las mutaciones en los genes de las topoisomerasas *gyrA* y *gyrB* que confieren resistencia a las quinolonas, en el gen *murA* que confiere resistencia a la fosfomicina y en el gen *folP* que confiere resistencia al sulfametoxazol. La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 presenta la mutación reportada (Yoshida, et al., 1990) en el codón Ser83 del gen de la topoisomerasa *gyrA* (figura 5) pero no presenta mutaciones en el gen *gyrB*, ni en el gen *murA*. La resistencia a todas las quinolonas probadas puede deberse a la sustitución del aminoácido Ser→Ile en el codón Ser83. La transición C→T que resulta en una sustitución del aminoácido Pro→Ser en la posición 64 del gen *folP* y que confiere resistencia a las sulfamidas también está ausente del genoma de esta cepa (Vedantam, et al., 1998). Este hecho confirma la susceptibilidad de esta cepa a las sulfonamidas.

Protein Sequences	↓																																		
Species/Abbrv	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*																	
1. <i>S. marcescens</i> _SmUNAM836	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	I	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
2. <i>S. marcescens</i> _Sm39	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	R	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
3. <i>S. marcescens</i> _CAV1492	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	I	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
4. <i>S. marcescens</i> _U36365	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
5. <i>S. marcescens</i> _SMB2099	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
6. <i>S. liquefaciens</i> _HUMV-21	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
7. <i>S. liquefaciens</i> _FDAARGOS_125	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
8. <i>S. rubidaea</i> _1122	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
9. <i>S. marcescens</i> _Db11	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
10. <i>Serratia</i> _sp_SCBI	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
11. <i>S. marcescens</i> _RSC-14	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
12. <i>S. marcescens</i> _B3R3	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
13. <i>S. ureilytica</i> _Lr54	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
14. <i>Serratia</i> _sp_YD25	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
15. <i>Serratia</i> _sp_FS14	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
16. <i>Serratia</i> _sp_ATCC_39006	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
17. <i>S. marcescens</i> _VW4	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
18. <i>S. fonticola</i> _GS2	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
19. <i>S. fonticola</i> _DSM_4576	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
20. <i>S. liquefaciens</i> _ATCC_27592	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
21. <i>S. multitudineis</i> _RB-25	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
22. <i>S. plymuthica</i> _4Rx13	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
23. <i>S. plymuthica</i> _3Rp8	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
24. <i>S. plymuthica</i> _AS9	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
25. <i>S. plymuthica</i> _AS12	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
26. <i>S. plymuthica</i> _S13	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
27. <i>S. plymuthica</i> _RVH1	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
28. <i>S. plymuthica</i> _PRI-2C	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
29. <i>S. proteamaculans</i> _568	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
30. <i>S. marcescens</i> _FGI_94	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
31. <i>S. nematodiphila</i> _DSM_21420	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	S	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G
32. <i>S. symbiotica</i> _str_Cinara_cedri	G	D	V	I	G	K	Y	H	P	H	G	D	T	A	V	D	T	I	V	R	M	A	Q	P	F	S	L	R	Y	M	L	V	D	G	G

Figura 5. Mutación en el codón Ser83 del gen de la topoisomerasa *gyrA* que confiere resistencia a quinolonas.

Datos de ensayos clínicos que incluyen pacientes con infecciones producidas por *Serratia* spp. y que sirven para evaluar y comparar la eficacia de varios antibióticos de uso médico son muy limitados (Moehring, et al., 2016). Sin embargo, el conocimiento del contenido genético relacionado con resistencia antimicrobiana nos permitirá poder elaborar un esquema de tratamiento antimicrobiano real contra infecciones producidas por este género bacteriano. En un estudio hecho en Alemania por Traub y su grupo entre 1980 y 1999 se reporta que *S. marcescens* y *S. liquefaciens* son susceptibles a las cefalosporinas, aztreonam, quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazole y resistentes a las penicilinas y polimixina B (Traub, 2000). Contrario a lo reportado por aquellos autores, la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 posee más resistencias, coincidiendo únicamente en susceptibilidad con ceftazidime, cloranfenicol, amikacina, gentamicina, y meropenem. Una razón podría ser la adquisición de resistencias en estas últimas décadas debido a las presiones a las que esta sometida la cepa en el ambiente hospitalario, razón por la cual la vigilancia epidemiológica del hospital juega un papel relevante en impedir la diseminación y controlar las cepas multirresistentes.

8. Genómica comparativa de 32 cepas de *Serratia* spp. a la luz de la HGT

Las secuencias homólogas de genes expresan proteínas con estructuras y frecuentemente funciones similares, aunque la relación entre homología y función no es siempre predecible. La estrategia más usada para inferir similitud en funciones es enfocándose en los ortólogos, esto es, en secuencias homólogas presentes en diferentes organismos (la misma proteína en diferentes organismos) (Pearson, 2013), por lo que en este trabajo se hizo un análisis comparativo entre los genomas de las diferentes especies de *Serratia*, incluyendo la cepa *S. marcescens* SmUNAM836, con la finalidad de identificar genes de resistencia compartidos o exclusivos de especie o de cepa y proponer el resistoma de este género (Sandner-Miranda, et al., 2018). Para ello se buscaron los genes potenciales de resistencia en enterobacterias usando las bases de datos CARD (ver arriba) y se identificaron primero en el genoma de la cepa de *S. marcescens* SmUNAM836. Posteriormente se alinearon, junto con la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 los otros 31 genomas de *Serratia* spp. depositados en el GenBank usando el programa Mauve 2.4.0., con el fin de localizar los genes de resistencia en los cromosomas y plásmidos de todas las cepas de este estudio. El programa BLASTN se usó para determinar el porcentaje de identidad entre estos genes, que es una medida de la similitud entre secuencias y por lo tanto un parámetro de homología. Los alineamientos de múltiples secuencias son más informativos para identificar secuencias homólogas (Pearson, 2013). En este estudio se encontró que las secuencias que el programa de Mauve indicaba como homólogas compartían más del 70% de identidad entre ellas cuando se realizaba el BLASTN. Además, el “e-value”, una medida estadística que reconoce la similitud entre secuencias era de cero o tendiendo a cero y los “score” que miden que tan bueno es el alineamiento tenían valores altos.

En este estudio comparativo se identificaron varias clases de genes involucrados en los diferentes mecanismos de resistencia antimicrobiana mencionados arriba, incluyendo, además de los genes de resistencia antimicrobiana, los genes de regulación, los de las bombas de eflujo y los de las porinas. Los genes usados en este estudio se pueden ver en las tablas 1-S y 2-S.

Usando varias bases de datos de genes de resistencia antimicrobiana (mencionados arriba) y varios programas de alineamiento como BLASTN, Mega7 y Mauve 2.4.0 se identificaron 123 diferentes clases de genes asociados a la resistencia antimicrobiana en los genomas de las 32 cepas de *Serratia* spp.: 33 son genes de resistencia intrínseca, 16 son genes de resistencia adquirida (13 en plásmidos, 2 en transposones y el gen *gyrA* con mutaciones que

confieren resistencia a las quinolonas) (figura 6) y 74 son genes relacionados a 36 sistemas de eflujo pertenecientes a las 5 diferentes familias (MATE, SMR, MFS, RND y ABC), que incluyen genes de transporte, de regulación, porinas y varios alelos en diferentes loci (figura 7). Tres de estos genes fueron localizados en plásmidos.

En este análisis de genómica comparativa reportamos que el resistoma de *Serratia* spp. consta de genes que comparten la mayoría de las cepas del género, de genes exclusivos de especies y de genes exclusivos de individuo. El resistoma también se puede clasificar según el nicho o estilo de vida de la bacteria. En este estudio utilizamos 3 tipos de estilos de vida: patógenos (nosocomiales y patógenos de animales), ambientales (suelo/plantas, agua, alimentos) y simbiotes. De estos 123 determinantes de resistencia (107 determinantes de resistencia intrínseca y 16 genes de resistencia adquirida), 80 están presentes en una o más cepas de cada nicho, 7 genes los comparten cepas patógenas y ambientales únicamente, 2 los comparten cepas patógenas y simbióticas y sólo un gen es compartido por cepas ambientales y simbióticas. Dieciocho genes de resistencia se encontraron exclusivamente en cepas patógenas, 14 exclusivamente en cepas ambientales y se encontró solamente un gen de resistencia único de cepas simbióticas. La mayoría de los genes exclusivos de cepa o nicho pertenecen al grupo de genes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal en plásmidos, transposones o islas genómicas (figura 8).

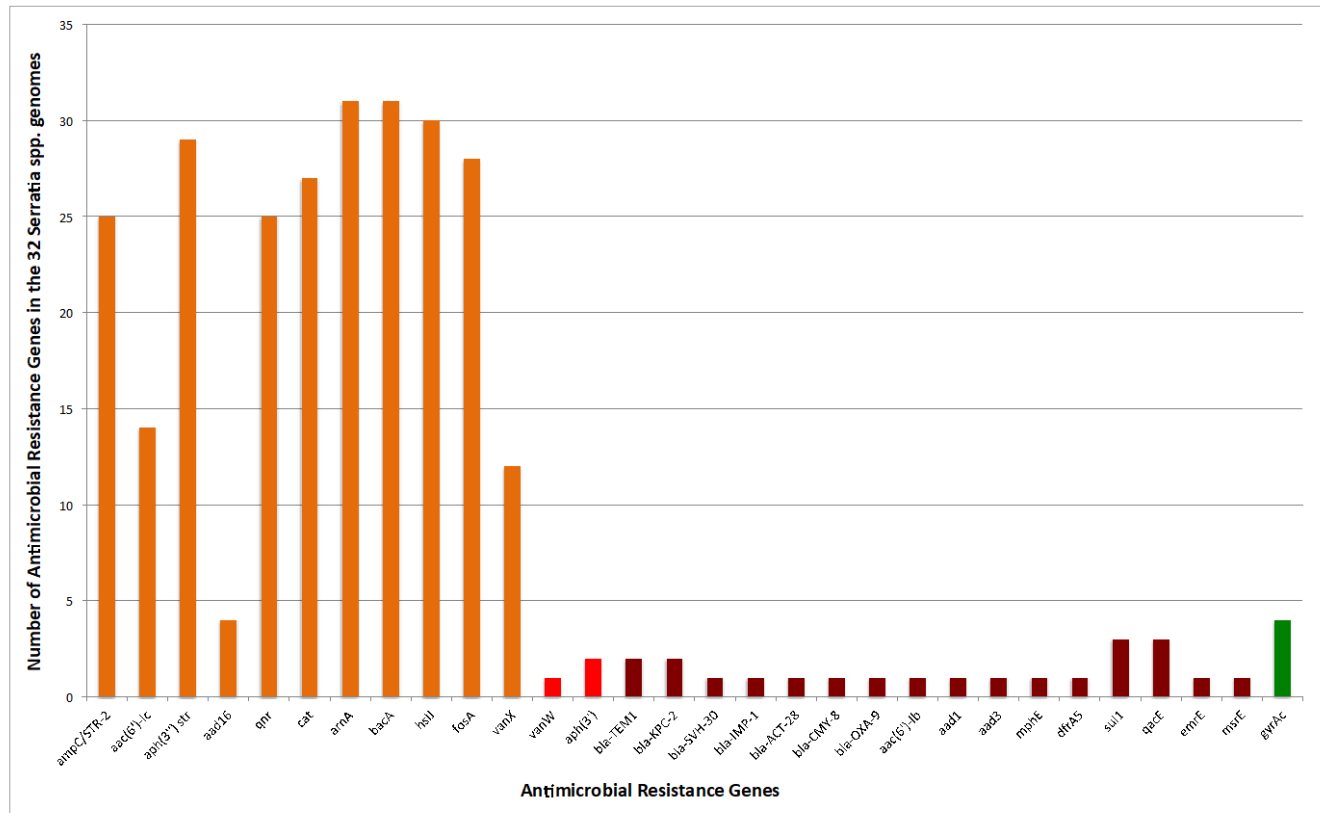


Figura 6. Número de genes de resistencia intrínseca (naranja) y adquirida en plásmidos (rojo oscuro), en transposones (rojo claro) y adquirida por mutaciones (verde) identificados en los 32 genomas de *Serratia* spp.

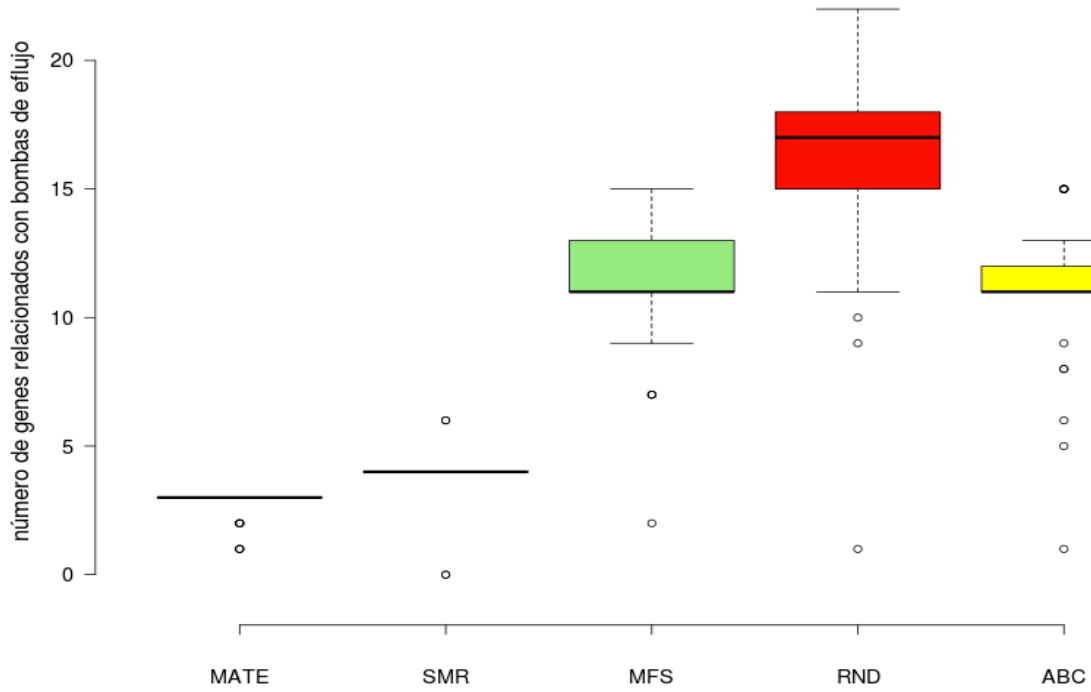


Figura 7. Diagrama de caja que ilustra el número de genes asociados a bombas de eflujo de los 32 genomas de *Serratia* spp.

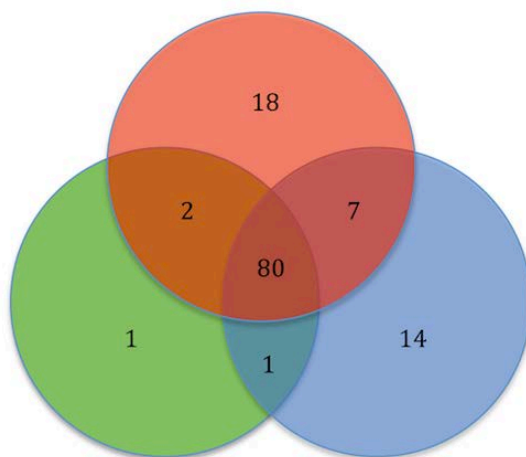


Figura 8. Diagrama de Venn que muestra el resistoma de *Serratia* spp. basado en el nicho: patógenos (rojo), ambientales (azul), cepas simbióticas (verde).

8.1. Genes de resistencia intrínseca y bombas de eflujo

Entre los genes de resistencia intrínseca se encontraron los genes *ampC*, *aac(6')-Ic*, *aph(3'')str*, *aadA16*, 6 alelos del gen *qnr*, el gen *cat* que confiere resistencia al cloranfenicol, todos los genes involucrados en la resistencia a polimixina B (operón *arn*), los genes *bacA*, *fosA*, *hslJ* y *vanX* que confieren resistencia a bacitracina, fosfomicina, novobiocina y vancomicina respectivamente. Se identificaron un máximo de 58 genes asociados a bombas de eflujo por cepa, pertenecientes a 36 diferentes sistemas de eflujo de las 5 familias descritas: MSF (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance Nodulation Division family), ABC (ATP Binding Cassette superfamily), MATE (Multidrug And Toxic compounds Extrusion family) y SMR (Small Multidrug Resistance family). La cepa con el mayor número de genes asociados a bombas de eflujo es la cepa nosocomial *S. marcescens* SmUNAM836 y la de menor número de genes de sistemas de eflujo la cepa simbiote co-obligada con tan solo 5 genes. Los genes que codifican para las bombas de eflujo de la familia RND son los más abundantes (figura 7).

8.2. Genes de resistencia adquirida

Se identificaron en los 32 genomas de este estudio un total de 16 genes de resistencia adquirida en elementos móviles y en mutaciones del gen *gyrA* (13 en plásmidos, 2 en transposones cromosomales y el gen *gyrA* con mutaciones en el codón Ser83). Además, se encontraron 3 genes de bombas de eflujo en plásmidos de las cepas nosocomiales *S. marcescens* CAV1942 y *S. marcescens* Sm39: QacE, QacH y MsrE. El escrutinio de islas genómicas de toda la muestra está fuera del alcance de este trabajo (tabla 2-S). Se identificaron 3 genes de resistencia adquirida a aminoglucósidos: *aac(6')-Ib*, *aad1* y *aad2* en los plásmidos de las cepas nosocomiales *S. marcescens* CAV1942 y *S. marcescens* SM39 y el gen *aph(3')* en transposones de dos cepas de la especie *S. rubidaea* (una de ellas mal clasificada como *Serratia* sp. FGI94). Siete genes de resistencia a β -lactámicos, los genes de las β -lactamasas clase A *bla_{TEM-1}*, *bla_{KPC-2}*, *bla_{SVH-30}*, en plásmidos de las cepas nosocomiales *S. marcescens* SmUNAM836 y *S. marcescens* CAV1492 respectivamente, los genes de la β -lactamasa clase B *bla_{IMP-1}* en el plásmido de la cepa nosocomial *S. marcescens* SM39, los de las β -lactamasas clase C *bla_{CMY-8}* y *bla_{ACT-28}* en los plásmidos de la cepa nosocomial *S. marcescens* SM39 y en una cepa ambiental asociada a plantas *S. fonticola* GS2 y el gen de la β -lactamasa clase D *bla_{OXA-9}* en uno de los plásmidos de la cepa nosocomial *S. marcescens* CAV1492. También fueron localizados en los plásmidos de las

cepas nosocomiales *S. marcescens* CAV1942 y *S. marcescens* SM39 los genes *dfrA5* de resistencia al trimetoprim y los genes *sulI* y *emrE* de resistencia a las sulfonamidas. Los genes de resistencia a macrólidos *mphE* y *msrE* se identificaron en los plásmidos de *S. marcescens* CAV149. El gen *qacE* que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio se encontró también en los plásmidos de *S. marcescens* CAV1942 y *S. marcescens* SM39. Una cepa ambiental aislada de agua, la cepa *S. fonticola* DSM4576 presentó en un transposón el gen que confiere resistencia a la vancomicina, el gen *vanW*. También se encontraron 4 cepas con la mutación puntual en el gen de la topoisomerasa *gyrA* en la posición Ser83 que confiere la resistencia a las quinolonas (Weigel, et al., 1998; Hopkins, et al., 2005). Resulta interesante que tres de las cuatro cepas nosocomiales presentan esta mutación, *S. marcescens* SmUNAM836 y *S. marcescens* CAV1492 presentan un residuo de isoleucina en el codón 83 en vez de la serina observada en las cepas silvestres y la cepa *S. marcescens* Sm39 presenta una arginina en esta misma posición. La cepa simbiótica co-obligada *S. symbiotica* 'Cinara Cedri' tiene un residuo de treonina. Estas mutaciones podrían inducir un cambio conformacional de la subunidad A de esta enzima modificando así su afinidad con las quinolonas (Yoshida, et al., 1990). Vale la pena notar que los genes de resistencia adquiridos en plásmidos se encontraron únicamente en las tres cepas nosocomiales de *Serratia marcescens* y en una cepa ambiental.

En la figura 6 se muestra el número de genes de resistencia intrínseca (naranja), adquirida (rojo) y adquirida por mutaciones (verde) de toda la muestra. Como se puede observar, la mayor parte del resistoma del género está compuesto por genes de resistencia intrínseca, aunque hay un gran número de genes de resistencia adquirida, pero en pocas cepas, principalmente en cepas nosocomiales.

8.3. Frecuencia de genes de resistencia según la clase del antibiótico en el resistoma de *Serratia* spp.

La frecuencia de genes de resistencia antimicrobiana a cada clase o familia de antibiótico (genes de bombas de eflujo no están incluidos) en toda la muestra de estudio es: 56.22% a antibióticos péptidos (polimixina B, colistina, vancomicina y bacitracina), 20.38% a β -lactámicos, 7.11% asociada a la resistencia a aminoglucósidos, 4.1% a los aminocumáricos (novobiocina), 3.96% a quinolonas, 3.83% a los fosfónicos, 3.69% al cloranfenicol, 0.54% a las sulfonamidas y 0.13% a los macrólidos (figura 9). No sorprende que el mayor porcentaje de

genes de resistencia de la muestra es a los antibióticos péptidos ya que todas las cepas, con excepción de la simbiote obligada, tienen los genes de resistencia en su genoma (tablas 1-S y 2-S) y además está reportado que las bacterias del género *Serratia* son intrínsecamente resistentes a la polimixina B (Olaitan, et al., 2014). Los genes de resistencia a β -lactámicos representan el segundo mayor porcentaje en la población de estudio. Esto es de esperar debido a la gran cantidad de genes de resistencia a esta clase de antibiótico adquiridos por transferencia horizontal. Además, se han descrito a la fecha alrededor de 1000 genes relacionados a la resistencia a β -lactámicos, entre ellos se incluyen clases de genes nuevos y sus mutantes que se han encontrado en nichos geográficos remotos (Allen, et al., 2009; Bush, et al., 2010). Es importante notar que los genes de resistencia adquirida a β -lactámicos identificados en esta muestra de 32 genomas son exclusivos de bacterias nosocomiales, con la excepción del gen *bla_{ACT-28}*, que codifica para una β -lactamasa de la clase C identificado en uno de los plásmidos de una cepa ambiental asociada a plantas. La transferencia horizontal de genes a jugado un papel predominante en la evolución y transmisión de la resistencia a los antibióticos β -lactámicos entre las bacterias entéricas, tanto ambientales como nosocomiales (Davies, et al., 2010).

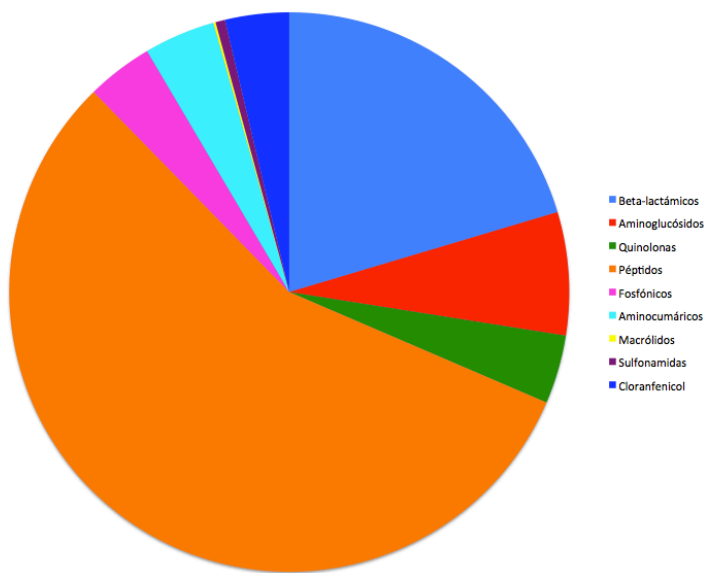


Figura 9. Frecuencia de genes de resistencia según la clase o familia de antimicrobianos en el resistoma de *Serratia* spp.

9. Relaciones filogenéticas del género *Serratia* y número de determinantes de resistencia

Se construyó un árbol pangénomico de parsimonia con los 32 genomas de *Serratia* spp. derivado de una matriz pangénomica consenso de presencia/ausencia de genes homólogos y con base a los algoritmos de agrupación COGtriangles y OrthOMCL utilizando el programa GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). El diagrama de Venn (figura 10) muestra el número de genes del pangenoma compartidos por las 32 cepas (12,347 genes) con los que se generó la matriz y el árbol. Este pangenoma es relativamente grande dado el pequeño número de muestra que se usó (32 genomas). El árbol pangénomico (figura 11) muestra 5 grupos principales, en el grupo A se encuentran todas las cepas de la especie *S. marcescens* con la excepción de la cepa *S. nematodiphila* que es un simbiote de nemátodo y un patógeno de insecto (Kwak, et al., 2015) y la cepa *S. ureylitica*, una cepa ambiental aislada de aguas termales (cabe la posibilidad de que estas cepas estén mal clasificadas taxonómicamente). En este grupo también se encuentran la mayoría de las cepas patógenas con el mayor número de genes de resistencia adquirida y genes asociados a bombas de eflujo. En el grupo B se localizan las cepas pertenecientes a las especies *S. plymuthica*, *S. liquefaciens* y *S. proteomaculans* que son todas cepas ambientales, con la excepción de las cepas nosocomiales *S. liquefaciens* HUMV-21 que fue aislada de una úlcera de un paciente hospitalizado en España y *S. liquefaciens* FDAAGOS_125. El grupo C está representado por dos cepas, la cepa *Serratia* sp. FGI94 simbiote de un hongo y la cepa de la especie *S. rubidaea* que fue aislada del esputo de un paciente en China. Estas dos cepas deben de pertenecer a la misma especie, se agrupan como especies hermanas en esta filogenia, además poseen un tamaño cromosómico muy parecido y son las únicas que tienen en un transposón el gen de resistencia a aminoglucósidos *aph(3')*. El grupo D consta de las dos cepas ambientales de la especie *S. fonticola*. El grupo E agrupa a 3 cepas distantemente relacionadas entre si filogenéticamente, la cepa *S. multitudinisentens* (reclasificada recientemente como *Chania multitudinisentens*, Ee et al., 2016) aislada de un basurero, la cepa *Serratia* sp. ATCC 39006 aislada de agua y la cepa simbiote co-obligada de áfido *S. symbiotica* ‘*Cinara Cedri*’. Estas tres cepas son las que menor número de genes de resistencia presentan. No fue posible hacer una correlación entre los grupos de cepas y la región geográfica en la cual fueron aisladas debido a que la muestra está sesgada ya que las cepas europeas son en su gran mayoría cepas ambientales asociadas a la promoción del crecimiento de plantas.

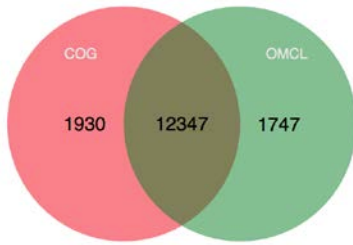


Figura 10. Diagrama de Venn del pangenoma de *Serratia* spp. generado por los algoritmos COG y OMCL.

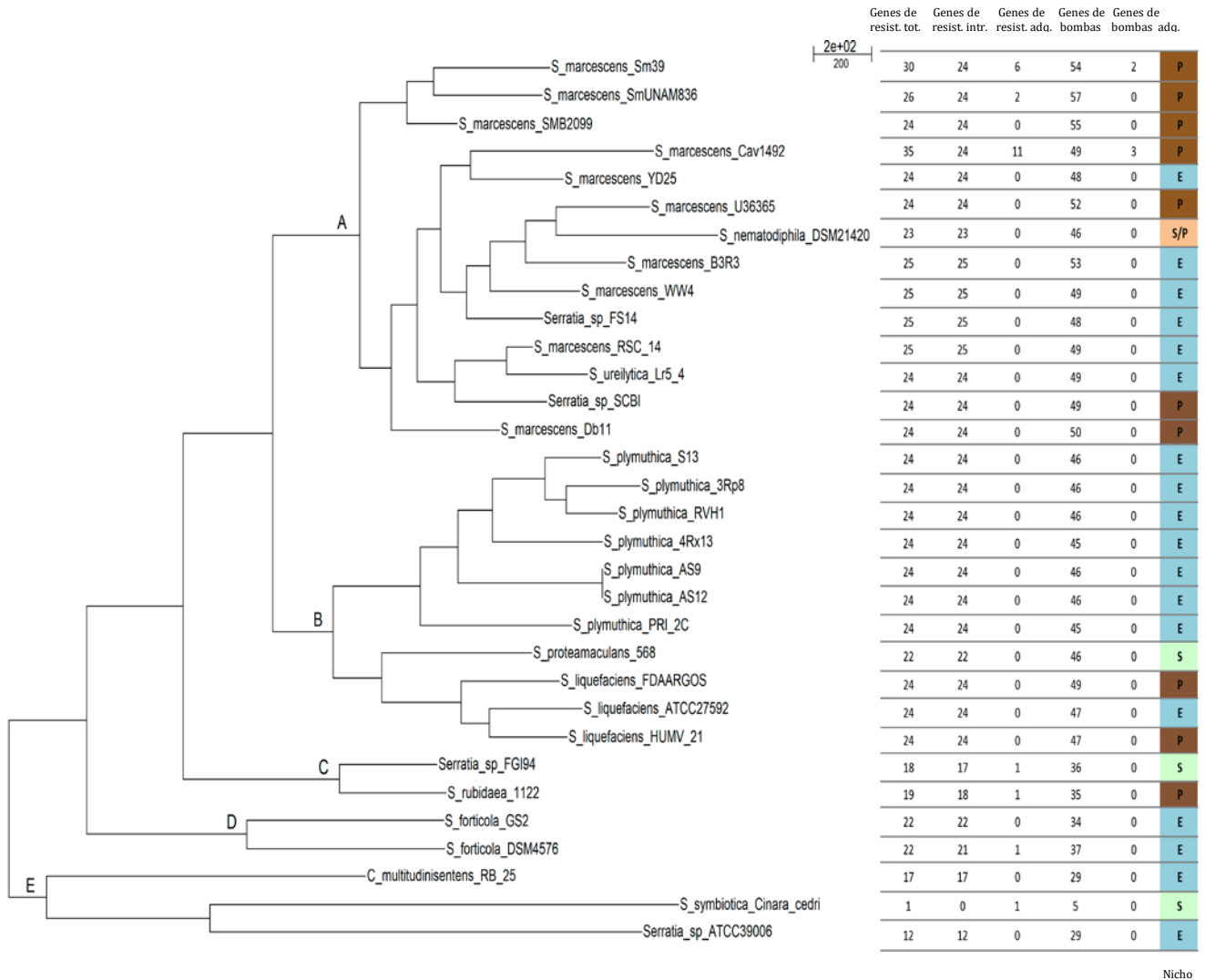


Figura 11. La figura muestra un árbol pangenómico de parsimonia de los 32 genomas de *Serratia* spp. derivado de una matriz pangenómica consenso de presencia/ausencia de genes homólogos con base a los algoritmos de agrupación COGtriangles y OrthoMCL. Esta filogenia fue la más parsimoniosa encontrada en una búsqueda realizada con PARS del programa PHYLIP. El árbol tiene un largo total de 20,453 pasos.

10. Conclusión

El escrutinio detallado del genoma de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 revela la presencia de varios elementos móviles como islas genómicas, profagos y plásmidos que son los portadores de material genético transferido horizontalmente de otras bacterias pertenecientes a la misma especie o a especies y géneros filogenéticamente distantes. Entre los genes asociados a islas genómicas encontramos genes de resistencia a antibióticos, genes para formación de biofilms, fimbrias, sideróforos y genes del citocromo C oxidasa. La mayoría de los profagos tienen genes relacionados a la biogénesis del virus, pero algunos portan transposones, genes que codifican para toxinas, como la toxina HipA que contribuye a la persistencia del hospedero en ambientes con antimicrobianos y genes de tolerancia a metales pesados (*terA*). El plásmido de esta cepa es homólogo a un plásmido de *K. pneumoniae* y presenta el gen de la β -lactamasa A de amplio espectro *bla*_{TEM-1} que confiere resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos.

Se localizaron genes de bombas ubicados en islas genómicas de la cepa *S. marcescens* SmUNAM836 y que presentan una identidad de entre 82% y 84% con genes de *P. aeruginosa*, lo que indica una posible transferencia horizontal de genes entre ambos géneros.

Esta bacteria alberga una resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos de uso común. Esto plantea un enorme reto médico debido a la dificultad para elegir un tratamiento adecuado contra las infecciones provocadas por este género bacteriano. La cepa *S. marcescens* SmUNAM836 no presentó los genes *dfr5* y *sul1* asociados a la resistencia al trimetoprim y a las sulfonamidas respectivamente. Tampoco tiene la mutación en el codón 64 del gen *folP*, que resulta en una sustitución del aminoácido prolina a serina y que confiere resistencia a las sulfonamidas (Vedantam, et al., 1998), abriendo la posibilidad de usar el antibiótico trimetoprim-sulfametoxazole (Bactrim) como una terapia adecuada para esta especie.

El análisis de genómica comparativa de 32 genomas de *Serratia* spp. muestra que este género posee una multirresistencia a antimicrobianos muy importante, dada mayormente por genes cromosomales de resistencia intrínseca y por bombas de eflujo. También es relevante que cepas aisladas de ambientes nosocomiales posean un mayor número de genes de resistencia adquirida por transferencia horizontal en elementos móviles como plásmidos o transposones. Este hecho se puede deber a la presión selectiva a la que está sujeta la bacteria en presencia de antibióticos en el ambiente hospitalario. Las cepas nosocomiales con mayor número de genes de resistencia adquirida son *S. marcescens* CAV1429 y *S. marcescens* Sm39 con 14 y 8 genes

respectivamente en sus plásmidos, en su mayoría β -lactamasas. Se encontró que los genes de resistencia de los patógenos comparten una alta identidad de secuencia con los genes de las cepas ambientales. Este hecho es de suma importancia ya que apoya la hipótesis de que el medio ambiente representa una fuente natural de genes de resistencia a antibióticos (Riesenfeld, et al., 2004; Davies, et al., 2010) y no siempre es el ambiente hospitalario el reservorio de cepas multi-drogo resistentes. Los genes de resistencia de los aislados ambientales podrían originalmente haber tenido otras funciones diferentes a la de conferir resistencia a los antibióticos producidos por otras bacterias competidoras, estos genes actualmente han sido adquiridos por bacterias patógenas por medio de la transferencia horizontal de genes (Berglund, 2015).

La filogenia construida con los genes homólogos del pangenoma de los 32 genomas de *Serratia* spp. es congruente con otras filogenias realizadas mediante diferentes métodos, por ejemplo, con una filogenia basada en los genes del “core” que realizó nuestro grupo (Sandner-Miranda, et al., 2018). Basándonos en ambas filogenias es necesario que algunas cepas de este género sean reclasificadas, como por ejemplo la cepa *Serratia* sp. FGI94 que debe clasificarse como una *Serratia rubidaea* y las cepas no caracterizadas *Serratia* sp. SCBI y *Serratia* sp. FS14, así como las cepas *S. nematodiphila* DSM 21420 y *S. ureilytica* como *S. marcescens*. El pangenoma de esta especie es relativamente grande si se considera el pequeño tamaño de la muestra usada (32 genomas).

Es crucial poder vincular el fenotipo (antibiograma) basado en las pruebas de laboratorio con los datos genómicos para poder entender que genes de resistencia están en circulación y cuales son propensos a adquirirse por transferencia horizontal de genes (McArthur, et al., 2015). La secuenciación de genomas completos y la metagenómica están abriendo las puertas a un rápido diagnóstico que nos pueden mostrar los perfiles de resistencia basados en los genotipos (Bertelli, et al., 2013) de bacterias presentes en hospitales o en la comunidad y que, junto con la vigilancia epidemiológica, permitiría implementar medidas para reducir la resistencia antimicrobiana y disminuir la mortalidad asociada a enfermedades infecciosas de origen nosocomial.

11. Bibliografía

- Aendekerck, S., Diggle, S. P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P., et al. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*. 151, 1113–1125. doi:10.1099/mic.0.27631-0.
- Ajithkumar, B., Ajithkumar, V. P., Iriye, R., Doi, Y., and Sakai, T. (2003). Spore-forming *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* subsp. nov., isolated from a domestic wastewater treatment tank. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 253–258. doi:10.1099/ijms.0.02158-0.
- Akhter, S., Aziz, R. K., and Edwards, R. A. (2012). PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies. *Nucleic Acids Res.* 40(16), e126. doi:10.1093/nar/gks406.
- Al-Khodor, S., Price, C. T., Kalia A., and Kwaik, Y.A. (2010). Ankyrin-repeat containing proteins of microbes: a conserved structure with functional diversity. *Trends Microbiol.* 18, 132–139. doi:10.1016/j.tim.2009.11.004.
- Aldema, M. L., McMurry, L. M., Walmsley, A. R., and Levy, S. B. (1996). Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* 19, 187–195. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.359886.x.
- Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J., Gaarder, A., and Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 3, 243–251. doi:10.1038/ismej.2008.86.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321–331.
- Anderson, M. T., Mitchell, L. A., and Mobley, H. L. T. (2017). Cysteine biosynthesis controls *Serratia marcescens* phospholipase activity. *J. Bacteriol.* 199(16), e00159–17. doi:10.1128/JB.00159-17.
- Ashelford, K. E., Fry, J. C., Bailey, M. J., and Day, M. J. (2002). Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 2281–2289. doi:10.1099/ijms.0.02263-0.
- Bhadra, B., Roy, P., and Chakraborty, R. (2005). *Serratia ureilytica*, sp. nov., a novel urea-utilizing species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2155–2158.

- Begic, S., and Worobec, E. (2008). Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can. J. Microbiol.* 54, 411–6. doi:10.1139/w08-019.
- Begley, T. J., and Samson, L. D. (2003). AlkB mystery solved: oxidative demethylation of N1-methyladenine and N3-methylcytosine adducts by a direct reversal mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 28, 2–5. doi:10.1016/S0968-0004(02)00010-5.
- Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect. Ecol. Epidemiol.* doi:10.3402/iee.v5.28564.
- Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreulx, D., Chippaux, M., and Denizot, F. (2005). BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J. Biol. Chem.* 280, 28852–28857. doi:10.1074/jbc.M413750200.
- Bertelli, C., and Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 803–813. doi:10.1111/1469-0691.12217.
- Bertrand, X., and Dowzicky, M. J. (2012). Antimicrobial susceptibility among Gram-negative isolates collected from Intensive Care Units in North America, Europe, the Asia-Pacific Rim, Latin America, the Middle East, and Africa between 2004 and 2009 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin. Ther.* 34, 124–137. doi:10.1016/j.clinthera.2011.11.023.
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. (2004). In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics.* 20, 798-9. doi:10.1093/bioinformatics/btg491.
- Bizio, B. (1823). Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Bibl. Ital. G. Lett. Sci. Art.* (Anno VIII) 30:275–295. (In Italian).
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Bland, C., Ramsey, T. L., Sabree, F., Lowe, M., Brown, K., Kyripides, N. C., et al. (2007). CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics.* 8, 209. doi:10.1186/1471-2105-8-209.
- Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 354, 484–491. doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb27987.x.

- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L. A., and Albrecht-Gary, A. M. (2012). Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalt. Trans.* 41, 2820. doi:10.1039/c1dt11804h.
- Brown, D. G., Swanson, J. K., and Allen, C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2777–2786. doi:10.1128/AEM.00984-06.
- Bush, K., and Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976. doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 10, 421. doi:10.1186/1471-2105-10-421.
- Cescau, S., Cwerman, H., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C., and Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *BioMetals.* 20 (3-4), 603-613. doi:10.1007/s10534-006-9050-y.
- Challis, G. L., and Naismith, J. H. (2004). Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 748–756. doi:10.1016/j.sbi.2004.10.005.
- Chen, J., Kuroda, T., Huda, M. N., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 176–179. doi:10.1093/jac/dkg308.
- Chen, L. H., Zheng, D. D., Liu, B., Yang, J. and Jin, Q. (2016). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis-10 years on. *Nucleic Acids Res.* 44 (Database issue):D694-D697.
- Chiang, P. C., Wu, T. L., Kuo, A. J., Huang, Y. C., Chung, T. Y., Lin, C. S., et al. (2013). Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. *Int. J. Infect. Dis.* 17,e718–e722. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.012.
- Chin, C. S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., et al. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat. Methods.* 10, 563–569. doi:10.1038/nmeth.2474.
- Chung, Y. J., and Saier, M. H. (2002) Overexpression of the *Escherichia coli sugE* gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J. Bacteriol.* 184, 2543–2545. doi:10.1128/JB.184.9.2543-2545.2002.

- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Sixth Informational Supplement. M100–S26. Wayne, PA: CLSI.
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi:10.1128/AEM.02411-13.
- Cordero, O. X., and Hogeweg, P. (2009). The impact of long-distance horizontal gene transfer on prokaryotic genome size. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21748–21753. doi:10.1073/pnas.0907584106.
- D’Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science.* 311, 374–377. doi:10.1126/science.1120800.
- Darling, A. E., Mau, B., and Perna, N. T. (2010). Progressive Mauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0011147.
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- Dawczynski, K., Proquitté, H., Roedel, J., Edel, B., Pfeifer, Y., and Hoyer, H. et al. (2016). Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the neonatal Intensive Care Unit, Jena, Germany, 2013–2014. *Infection.* 1-8. doi:10.1007/s15010-016-0922-y.
- Dhillon, B. K., Laird, M. R., Shay, J. A., Winsor, G. L., Lo, R., Nizam, F., et al. (2015). IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Res.* 43, W104–W108. doi:10.1093/nar/gkv401.
- Ee, R., Lim, Y. L., Yin, W. F., See-Too, W. S., Roberts, R. J., and Chan, K. G. (2016). Novel methyltransferase recognition motif identified in *Chania multitudinisentens* RB-25T gen. nov., sp. nov. *Front. Microbiol.* 7:1362. doi: 10.3389/fmicb.2016.01362.
- Engelhart, S., Saborowski, F., Krakau, M., Scherholz-Schlösser, G., Heyer, I., and Exner, M. (2003). Severe *Serratia liquefaciens* sepsis following vitamin C infusion treatment by a naturopathic practitioner. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3986–3988. doi:10.1128/JCM.41.8.3986-3988.2003.
- Fàbrega, A., Martín, R. G., Rosner, J. L., Tavio, M. M., and Vila, J. (2010). Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the *marA-soxS-rob* regulon, *mdtG*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1218–1225. doi:10.1128/AAC.00944-09.

- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., et al. (2016). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.* 44, D279–D285. doi:10.1093/nar/gkv1344.
- Fitzpatrick, A. W. P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J. N., Bai, X. C., Okada, U., et al. (2017). Structure of the MacAB–TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol.* 2, 17070. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.70.
- Frawley, E. R., Crouch, M. L. V, Bingham-Ramos, L. K., Robbins, H. F., Wang, W., Wright, G. D., et al. (2013). Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 12054–12059. doi:10.1073/pnas.1218274110.
- Furukawa, H., Tsay, J. T., Jackowski, S., Takamura, Y., and Rock, C. O. (1993). Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J. Bacteriol.* 175, 3723–3729.
- Galhardo, R. S., Hastings, P. J., and Rosenberg, S. M. (2007). Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 399-435. doi:10.1080/10409230701648502.
- Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P. A., Leclerc, H., Lefebvre, B. and Mossel, D. A. A. (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29, 92–101.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Falsen, E., Ollivier, B., and Cuny, G. (2010). *Serratia glossinae* sp. nov., isolated from the midgut of the tsetse fly *Glossina palpalis gambiensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1261–1265. doi:10.1099/ij.s.0.013441-0.
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., and Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell.* 52, 248–254. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.045.
- Gray, K. M., and Garey, J. R. (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology.* 147, 2379–2387. doi:10.1099/00221287-147-8-2379.
- Grimes, M. (1961). Classification of the *Klebsiella-Aerobacter* group with special reference to the cold-tolerant mesophilic *Aerobacter* types. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* 11, 111–129. doi:10.1099/0096266X-11-4-111.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., and Irino, K. (1983). Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov. *Curr. Microbiol.* 7, 69–74.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., Richard, C., Davis, B. R., Steigerwalt, A. G., and Brenner, D. J. (1978). Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain: ICPB 3995). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28:453– 463.

- Grimont, P. A. D., Grimont, F., and Dulong de Rosney, H. L. C. (1977). Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* 98:39–66
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., and Starr, M. P. (1979). *Serratia ficaria* sp. nov., a bacterial species associated with Smyrna figs and the fig wasp *Blastophaga psenes*. *Curr. Microbiol.* 2, 277–282.
- Grimont, P. A. D., Jackson, T. A., Ageron, E., and Noonan, M. J. (1988). *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 1–6.
- Grohskopf, L. A., Roth, V. R., Feikin, D. R., Arduino, M. J., Carson, L. A., Tokars, J. I., et al. (2001). *Serratia liquefaciens* bloodstream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. *N. Engl. J. Med.* 3, 1491–1497. doi:10.1056/NEJM200105173442001.
- Gunn, J. S., Alpuche-Aranda, C. M., Loomis, W. P., Belden, W. J., and Miller, S. I. (1995). Characterization of the *Salmonella typhimurium* *pagC/pagD* chromosomal region. *J. Bacteriol.* 177, 5040–5047.
- Gupta, N., Hocevar, S. N., Moulton-Meissner, H. A., Stevens, K. M., McIntyre, M. G., Jensen, B., et al. (2014). Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1–8. doi:10.1093/cid/ciu218.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., et al. (2015). Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Res.* 25, 1060–1073. doi:10.1038/cr.2015.94.
- Hervé, B., Chomali, M., Gutiérrez, C., Luna, M., Rivas, J., Blamey, R., et al. (2015). Outbreak due to *Serratia marcescens* associated with intrinsic contamination of aqueous chlorhexidine. *Rev. Chil. infectología* 32, 517–22. doi:10.4067/S0716-10182015000600004.
- Hocquet, D., Nordmann, P., Garch, F. El, Plésiat, P., Cabanne, L., and Ple, P. (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1347–1351. doi:10.1128/AAC.50.4.1347.
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., and Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25, 358–373. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006.

- Hu, Y., Zhu, Y., Ma, Y., Liu, F., Lu, N., Yang, X., et al. (2015). Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1152–1161. doi:10.1128/AAC.04260-14.
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., and Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics.* 11, 119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Kikuchi, T., Ogura, Y., Katsura, K., Ohnishi, M., et al. (2015). A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res. An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes.* 22(1), 101–107. doi:10.1093/dnares/dsu043.
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., et al. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome Biol. Evol.* 6, 2096–2110. doi:10.1093/gbe/evu160.
- Iredell, J., Brown, J., and Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *Bmj.* h6420. doi:10.1136/bmj.h6420.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., and Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188, 745–758. doi:10.1128/JB.188.2.745.
- Kaczmarek, F. M., Dib-Hajj, F., Shang, W., and Gootz, T. D. (2006). High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3396–3406. doi:10.1128/AAC.00285-06.
- Kumar, A., and Worobec, E. A. (2005). Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1495–1501. doi:10.1128/AAC.49.4.1495.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9, 299-306. doi:10.1093/bib/bbn017.
- Kwak, Y., Khan, A.R., Shin, and J. H. (2015) Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. *J Biotechnol* **193**:1-2.

- Labbate, M., Queck, S. Y., Koh, K. S., Rice, S. A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004). Quorum Sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186, 692–698. doi:10.1128/JB.186.3.692-698.2004.
- Lamelas, A., Pérez-Brocal, V., Gómez-Valero, L., Gosalbes, M. J., Moya, A. and Latorre, A. (2008). Evolution of the secondary symbiont “Candidatus *Serratia symbiotica*” in aphid species of the subfamily *Lachninae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13), 4236–4240. doi:10.1128/AEM.00022-08
- Laslett, D., and Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 32, 11–16. doi:10.1093/nar/gkh152.
- Lau, S. Y., and Zgurskaya, H. I. (2005). Cell division defects in *Escherichia coli* deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. *J. Bacteriol.* 187, 7815–7825. doi: 10.1128/JB.187.22.7815-7825.2005.
- Lee, Y. H., Kim, S., Helmann, J. D., Kim, B. H., and Park, Y. K. (2013). RaoN, a small RNA encoded within *Salmonella pathogenicity island-11*, confers resistance to macrophage-induced stress. *Microbiol. (United Kingdom)* 159, 1366–1378. doi:10.1099/mic.0.066688-0.
- Lin, Q. Y., Tsai, Y. L., Liu, M. C., Lin, W. C., Hsueh, P. R., and Liaw, S. J. (2014). *Serratia marcescens* *arn*, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5181–5190. Doi:10.1128/AAC.00013-14.
- Liou, B. H., Duh, R. W., Lin, Y. T., Lauderdale, T. L. Y. ang, and Fung, C. P. (2014). A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47, 387–393. doi:10.1016/j.jmii.2013.04.003.
- Liu, D., Zhang, L. P., Huang, S. F., Wang, Z., Chen, P., Wang, H., et al. (2011). Outbreak of *Serratia marcescens* infection due to contamination of multiple-dose vial of heparin-saline solution used to flush deep venous catheters or peripheral trocars. *J. Hosp. Infect.* 77, 175–176. doi:10.1016/j.jhin.2010.10.003.
- Liu, R. and Ochman, H. (2007). Origins of flagellar gene operons and secondary flagellar systems. *J. Bacteriol.* 189(19), 7098–7104. <http://doi.org/10.1128/JB.00643-07>.
- Liu, X., Li, Y., Guo, Y., Zeng, Z., Li, B., Wood, T. K., et al. (2015). Physiological function of Rac prophage during biofilm formation and regulation of Rac excision in *Escherichia coli* K-12. *Sci. Rep.* 5, 16074. doi:10.1038/srep16074.
- Lobato-Márquez, D., Díaz-Orejas, R., García-del Portillo, F. (2016). Toxin-antitoxins and bacterial virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (5), 592–609. doi:10.1093/femsre/fuw022.
- Lomovskaya, O., Lewis, K., and Matin, A. (1995). EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 177, 2328-2334.

- Lou, H., Chen, M., Black, S. S., Bushell, S. R., Ceccarelli, M., Mach, T., et al. (2011). Altered antibiotic transport in OmpC mutants isolated from a series of clinical strains of multi-drug resistant *E. coli*. *PLoS One*. 6. doi:10.1371/journal.pone.0025825.
- Lu, S., and Zgurskaya, H. I. (2012). Role of ATP binding and hydrolysis in assembly of MacAB–TolC macrolide transporter. *Mol. Microbiol.* 86, 1132–1143. doi:10.1111/mmi.12046.
- Macdougall, C. (2011). Beyond susceptible and resistant, Part I: treatment of infections due to Gram-negative organisms with inducible β -lactamases. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 16, 23–30. doi:10.1056/NEJMra1313875.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 755–791. doi:10.1128/CMR.00017-11.
- Mammeri, H., Poirel, L., Bemer, P., Drugeon, H., and Nordmann, P. (2004). Resistance to cefepime and ceftipime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC β -lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 716–720. doi:10.1128/AAC.48.3.716-720.2004.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., et al. (2007). CDD: A conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35, 237–240. doi:10.1093/nar/gkl951.
- Mataseje, L. F., Boyd, D. A., Delport, J., Hoang, L., Imperial, M., Lefebvre, B., et al. (2014). *Serratia marcescens* harbouring SME-type class A carbapenemases in Canada and the presence of blaSME on a novel genomic island, SmarGI1-1. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1825–1829. doi:10.1093/jac/dku040.
- Matsuo, T., Chen, J., Minato, Y., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., et al. (2008). SmdAB, a heterodimeric ABC-type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190, 648–654. doi:10.1128/JB.01513-07.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3348–3357. doi:10.1128/AAC.00419-13.
- McArthur, A. G., and Wright, G. D. (2015). Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 45–50. doi:10.1016/j.mib.2015.07.004.

- McLenigan, M. P., Kulaeva, O. I., Ennis, D. G., Levine, A. S., and Woodgate, R. (1999). The bacteriophage P1 HumD protein is a functional homolog of the prokaryotic UmuD'-like proteins and facilitates SOS mutagenesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 7005–7013.
- McNally, A., Thomson, N. R., Reuter, S., and Wren, B. W. (2016). “Add, stir and reduce”: *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 177–190. doi:10.1038/nrmicro.2015.29.
- Merkier, A. K., Rodríguez, M. C., Togneri, A., Brengi, S., Osuna, C., Pichel, M., et al. (2013). Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2295–2302. doi:10.1128/JCM.03280-12.
- Miethke, M., and Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR, 71(3), 413–451. doi:10.1128/MMBR.00012-07.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49, 999–1002. doi:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x.
- Minato, Y., Shahcheraghi, F., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2008). Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 516–9. doi:10.1248/bpb.31.516.
- Mizunoe, Y., Matsumoto, T., Amako, K., Sekiguchi, M., and Kumazawa, J. (1991). Identification and nucleotide sequence of the gene determining the adhesion capacity of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 173(10), 3257–3260.
- Moehring R. and Mahlen S. (2016). Infections due to *Serratia* species. *UpToDate*. <https://www.uptodate.com/contents/infections-due-to-serratia-species#H26312143>.
- Morales-Espinosa, R., Soberón-Chávez, G., Delgado-Sapién, G., Sandner-Miranda, L., Méndez, J. L., González-Valencia, G., et al. (2012). Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS One.* 7. doi:10.1371/journal.pone.0037459.
- Morillo, Á., González, V., Aguayo, J., Carreño, C., Torres, M. J., Jarana, D., et al. (2016). A six-month *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal Intensive Care Unit. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 645–651. doi:10.1016/j.eimc.2016.01.006.
- Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–37. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

- Murdoch, S. L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M. J., Pourkarimi, E., and Coulthurst, S. J. (2011). The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes Type VI Secretion to target bacterial competitors. *J. Bacteriol.* 193(21), 6057–6069. doi:10.1128/JB.05671-11.
- Murphy, J., Mahony, J., Ainsworth, S., Nauta, A., and van Sinderen, D. (2013). Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7547–7555. doi:10.1128/AEM.02229-13.
- Nagy, T. A., Moreland, S. M., Andrews-Polymenis, H., and Detweiler, C. S. (2013). The ferric enterobactin transporter *fep* is required for persistent *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection. *Infect. Immun.* 81, 4063–4070. doi:10.1128/IAI.00412_13.
- Nawrocki, E. P., and Eddy, S. R. (2013). Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics.* 29, 2933–2935. doi:10.1093/bioinformatics/btt509.
- Nishino, K., Honda, T., and Yamaguchi, A. (2005). Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 187, 1763–1772. doi:10.1128/JB.187.5.1763.
- Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 5803–5812. doi:10.1128/JB.183.20.5803.
- Olaitan, A. O., Morand, S., and Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 1–18. doi:10.3389/fmicb.2014.00643.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., et al. (2014) The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42. doi:10.1093/nar/gkt1226.
- Paine, S. G., and Stansfield, H. (1919). Studies in bacteriosis. III. A bacterial leaf-spot disease of *Protea cynaroides*, exhibiting a host reaction of possibly bacteriolytic nature. *Ann. Appl. Biol.* 6:27–39.
- Paquelin, A., Ghigo, J. M., Bertin, S., and Wandersman, C. (2001). Characterization of HasB, a *Serratia marcescens* TonB-like protein specifically involved in the haemophore-dependent haem acquisition system. *Mol. Microbiol.* 42, 995–1005. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02628.x.
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–686. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
- Patrick, M., Gray, M., Sandkvist, M., and Johnson, T. (2010). Type II secretion in *Escherichia coli*, *EcoSal Plus*. doi:10.1128/ecosalplus.4.3.4

- Pearson, W. R. (2013). “An introduction to sequence similarity (“homology”) searching,” in *Current Protocol in Bioinformatics*, ed. A. D. Baxevanis et al. 3, 3.1. doi:10.1002/0471250953.bi0301s42.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* 8, 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701.
- Picker, M. A. and Wing, H. J. (2016). H-NS, its family members and their regulation of virulence genes in *Shigella* species. *Genes.* 7(12), 112. doi:10.3390/genes7120112.
- Potrykus, J., and Wegrzyn, G. (2001). Chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* strain expressing the chloramphenicol acetyltransferase *cat* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3610-3612. doi:10.1128/AAC.45.12.3610.
- Reyes, C. L., Ward, A., Yu, J., and Chang, G. (2006). The structures of MsbA: insight into ABC transporter-mediated multidrug efflux. *FEBS Lett.* 580, 1042–1048. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.033.
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M., and Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6, 981–989. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x.
- Rosenberg, E. Y., Ma, D., and Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* 182, 1754-1756. doi:10.1128/JB.182.6.2000.
- Salscheider, S. L., Jahn, A., and Schnetz, K. (2014). Transcriptional regulation by BglJ-RcsB, a pleiotropic heteromeric activator in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 42, 2999–3008. doi:10.1093/nar/gkt1298.
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa P., Cravioto A., and Morales-Espinosa R. (2018). The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2018.00828.
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Soberón-Chávez, G., and Morales-Espinosa, R. (2016). Complete genome sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a nonpigmented multidrug-resistant strain isolated from a Mexican patient with obstructive pulmonary disease. *Genome Announc.* 4, e01417-15. doi:10.1128/genomeA.01417-15.
- Karl J. Schreiber, K. J. and Desveaux, D. (2011). AlgW regulates multiple *Pseudomonas syringae* virulence strategies. *Mol. Microbiol.* 80(2), 364–377. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07571.x.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001.

- Schwocho, L. R., Schaffner, C. P., Miller, G. H., Hare, R. S., and Shaw, K. J. (1995). Cloning and characterization of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(3)-Ib* from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1790–1796.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- Shahcheraghi, F., Minato, Y., Chen, J., Mizushima, T., Ogawa, W., Kuroda, T., et al. (2007). Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 798–800. doi:10.1248/bpb.30.798.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., and Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamase: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 90–101. doi:10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- Shanks, R. M. Q., Davra, V. R., Romanowski, E. G., Brothers, K. M., Stella, N. A., Godbole, D., et al. (2013). An eye to a kill: using predatory bacteria to control Gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One.* 8, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0066723.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., and Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138–163. doi:10.1016/j.abb.2004.09.003.
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Sabatelli, F. J., Mann, P., Munayyer, H., Mierzwa, R., et al. (1992). Characterization of the chromosomal *aac(6′)-Ic* gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1447–1455. doi:10.1128/aac.36.7.1447.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, 32–36. doi:10.1093/nar/gkj014.
- Simonet, V., Mallaéa, M., and Pagès, J. M. (2000). Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 311–315. doi:10.1128/AAC.44.2.311-315.2000.
- Šiširak, M., and Hukić, M. (2013). An outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*: the importance of continuous monitoring of nosocomial infections. *Acta Med. Acad.* 42, 25–31. doi:10.5644/ama2006-124.67.
- Stapp, C. (1940). *Bacterium rubidaeum* nov. sp. *Zentralbl. Bakteriol.* II Abt. 102:251–260.
- Sunenshine, R. H., Tan, E. T., Terashita, D. M., Jensen, B. J., Kacica, M. A., Sickbert-Bennett, E. E., et al. (2007). A multistate outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infection associated with contaminated intravenous magnesium sulfate from a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.* 45, 527–533. doi:10.1086/520664.

- Traub, W. H. (2000). Antibiotic susceptibility of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens*. *Chemotherapy*. 46, 315–321. doi:7304.
- Treangen, T.J., Sommer, D. D., Angly, F. E., Koren, S., and Pop, M. (2012). “Next generation sequence assembly with AMOS”, in *Current Protocol in Bioinformatics*, 11,11.8. doi:10.1002/0471250953.bi1108s3.
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2:203. doi:10.3389/fmicb.2011.00203.
- Vedantam, G., Guay, G. G., Austria, N. E., Doktor, S. Z., and Nichols, B. P. (1998). Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 88–93.
- Velasco, C., Rodríguez-Martínez, J. M., Briales, A., Díaz de Alba, P., Calvo, J., and Pascual, A. (2010). Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 239–242. doi:10.1093/jac/dkp424.
- Vetter, L., Schuepfer, G., Kuster, S. P., and Rossi, M. (2016). A hospital-wide outbreak of *Serratia marcescens*, and Ishikawa’s “Fishbone” analysis to support outbreak control. *Qual. Manag. Health Care.* 25, 1–7. doi:10.1097/QMH.0000000000000078.
- Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S. H., Pokusaeva, K., Sturino, J. M., et al. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat. Commun.* 1, 147. doi:10.1038/ncomms1146.
- Wang, X., and Wood, T. K. (2016). Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug Resist. Updat.* 27, 30–38. doi:10.1016/j.drup.2016.06.001.
- Webber, M., and Piddock, L. J. (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 32, 275–284. doi:10.1051/vetres:2001124.
- Wei, J. R., Tsai, Y. H., Soo, P. C., Horng, Y. T., Hsieh, S. C., Ho, S. W., and Lai, H. C. (2005). Biochemical characterization of RssA-RssB, a two-component signal transduction system regulating swarming behavior in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 5683–5690. doi:10.1128/JB.187.16.5683–5690.2005.
- Weigel, L. M., Steward, C. D., and Tenover, F. C. (1998). *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2661–2667.
- Wu, X, Tian, L, Zou, H, Wang, C, Yu, Z, Tan, C, et al. (2013). Outer membrane protein OmpW of *Escherichia coli* is required for resistance to phagocytosis. *Res. Microbiol.* 164, 848e855. doi:10.1016/j.resmic.2013.06.008

- Wu, Y. M., Hsu, P. C., Yang, C. C., Chang, H. J., Ye, J. J., Huang, C. T., et al. (2013). *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 46, 259–65. doi:10.1016/j.jmii.2012.07.006.
- Yao, X., Sun, Q., Liu, W., Yin, X., Pei, G., Wang, Y., et al. (2016). Complete genome sequence of *Serratia rubidaea* isolated in China. *Genome Announc.* 4(2): e00283-16. doi:10.1128/genomeA.00283-16.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., & Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1271–1272.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi:10.1093/jac/dks261.
- Zhang, C. W., Zhang, J., Zhao, J. J., Zhao, X., Zhao, D. F., Yin, H. Q., and Zhang, X. X. (2017). *Serratia oryzae* sp. nov., isolated from rice stems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67(8), 2928–2933. doi:10.1099/ijsem.0.002049.
- Zhang, C. X., Yang, S. Y., Xu, M. X., Sun, J., Liu, H., Liu, J. R. et al. (2009). *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1603–1608. doi:10.1099/ijms.0.65718-0.
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., and Wishart, D. S. (2011). PHAST: A fast phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 39, 347–352. doi:10.1093/nar/gkr485.



The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*

Luisa Sandner-Miranda¹, Pablo Vinuesa^{2†}, Alejandro Cravioto¹ and Rosario Morales-Espinosa^{1*}

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Axel Cloeckaert,
Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), France

Reviewed by:

Yongfei Hu,
Chinese Academy of Sciences, China
Jean-Yves Madec,
Agence Nationale de Sécurité
Sanitaire de l'Alimentation, de
l'Environnement et du Travail
(ANSES), France

*Correspondence:

Rosario Morales-Espinosa
marosari@unam.mx

[†] orcid.org/0000-0001-6119-2956

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 18 January 2018

Accepted: 11 April 2018

Published: 11 May 2018

Citation:

Sandner-Miranda L, Vinuesa P,
Cravioto A and Morales-Espinosa R
(2018) The Genomic Basis of Intrinsic
and Acquired Antibiotic Resistance
in the Genus *Serratia*.
Front. Microbiol. 9:828.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00828

Serratia marcescens, a member of the *Enterobacteriaceae* family, was long thought to be a non-pathogenic bacterium prevalent in environmental habitats. Together with other members of this genus, it has emerged in recent years as an opportunistic nosocomial pathogen causing various types of infections. One important feature of pathogens belonging to this genus is their intrinsic and acquired resistance to a variety of antibiotic families, including β -lactam, aminoglycosides, quinolones and polypeptide antibiotics. The aim of this study was to elucidate which genes participate in the intrinsic and acquired antibiotic resistance of this genus in order to determine the *Serratia* genus resistome. We performed phylogenomic and comparative genomic analyses using 32 *Serratia* spp. genomes deposited in the NCBI GenBank from strains isolated from different ecological niches and different lifestyles. *S. marcescens* strain SmUNAM836, which was previously isolated from a Mexican adult with obstructive pulmonary disease, was included in this study. The results show that most of the antibiotic resistance genes (ARGs) were found on the chromosome, and to a lesser degree, on plasmids and transposons acquired through horizontal gene transfer. Four strains contained the *gyrA* point mutation in codon Ser83 that confers quinolone resistance. Pathogenic and environmental isolates presented a high number of ARGs, especially genes associated with efflux systems. Pathogenic strains, specifically nosocomial strains, presented more acquired resistance genes than environmental isolates. We may conclude that the environment provides a natural reservoir for antibiotic resistance, which has been underestimated in the medical field.

Keywords: resistome, genus *Serratia*, antibiotics resistance genes, intrinsic resistance, acquired resistance

INTRODUCTION

Human infections caused by members of the genus *Serratia*, most commonly by *Serratia marcescens*, were not well identified until the latter half of the 20th Century, probably due to the taxonomic difficulty in describing the species. *S. marcescens* and to a lesser extent, other members of this genus, are now considered opportunistic nosocomial pathogens causing an array of infections including meningitis, sepsis, urinary tract infections, skin infections, bloodstream and respiratory infections, as well as being important ocular pathogens (Engelhart et al., 2003; Shanks et al., 2013; Wu et al., 2013; Gupta et al., 2014). *Serratia* species harbor several virulence factors including hemolysins (ShLAB), Quorum-Sensing proteins (LuxI-R), biofilm development

proteins (BsmB) (only seen in *S. marcescens*), phospholipases (PhIA), peptidases (Clp), metalloproteases, chitinases (ChiABC), siderophores and hemophores (HasA), the lipopolysaccharide LPS, and motility and adherence factors such as flagella and fimbriae (Mahlen, 2011). *S. marcescens* is among the 10 most recovered pathogens in hospitals worldwide (Mahlen, 2011; Bertrand and Dowzicky, 2012) and has been cultured from a variety of sources including disinfectants, pressure transducers, bronchoscopes, multi-dose medication vials, contaminated antiseptic solutions, fentanyl-containing fluids, contaminated MgSO₄ and contaminated saline syringes among others (Sunenshine et al., 2007; Liu et al., 2011; Chiang et al., 2013; Merquier et al., 2013; Šiširak and Hukić, 2013; Liou et al., 2014; Hervé et al., 2015; Dawczynski et al., 2016; Morillo et al., 2016; Vetter et al., 2016). Historically, outbreaks of *S. marcescens* have been reported since 1950 and have been considered nosocomial in origin (Mahlen, 2011). Recent *S. marcescens* outbreaks have been reported mostly in North America and Europe, probably due to more efficient surveillance systems in those regions. The majority of the outbreaks occurred in neonatal ICUs, cardiac surgical ICUs, orthopedic clinics and dialysis units. There have been some *S. liquefaciens* outbreak reports in past years in various countries (Grohskopf et al., 2001). Pathogenic strains from other *Serratia* species have been isolated from individual patients were not associated with any epidemic outbreak, as seen in the case of a *S. rubideae* isolated from the sputum of a patient in China (Yao et al., 2016). There is a large amount of published data about *Serratia* epidemiology and resistance patterns among human populations worldwide. The *S. marcescens* strains recovered in UCIs from 6 different geographic regions (Africa, Asia, the Asia-Pacific Rim, Europe, Latin America and North America) show a similar resistance/susceptibility pattern in all regions: resistance to all penicillins and susceptibility to all carbapenems. However, Latin American strains show a higher percentage of resistance to all antibiotic tested (Bertrand and Dowzicky, 2012).

Many members of the *Serratia* genus contain genes related to antimicrobial resistance, which confer resistance to β -lactam, aminoglycosides, quinolones, macrolides and polypeptide antimicrobials. Intrinsic resistance in microorganisms is conferred by antibiotic resistance genes (ARGs), including genes associated with efflux pumps, which are present on the chromosome and shared by members of the same species or genus. Acquired resistance is conferred by the gains of novel resistance genes via horizontal gene transfer (HGT) or by mutations of particular chromosomal genes. Generally, horizontally transferred resistance genes are located on mobile genetic elements, such as plasmids, integrons, transposons or genomic islands (Blair et al., 2014; Hu et al., 2015), and can be defined as any segment of DNA that can translocate from one part of the genome to another or, between genomes (Van Hoek et al., 2011).

The aim of this study was to identify the genes responsible for intrinsic and acquired multidrug-resistance (resistome) of the genus *Serratia* using 32 *Serratia* spp. genomes deposited in the NCBI database belonging to strains isolated from different ecological niches from 19 countries and 4 continents. We also

included the *S. marcescens* SmUNAM836 strain, which was previously sequenced by our group.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Genomes

Comparative genomic analysis was carried out using 32 whole, sequenced *Serratia* genomes retrieved from NCBI's GenBank and RefSeq repositories (**Supplementary Table S1**), including the *S. marcescens* SmUNAM836 strain, which was sequenced at the Yale Center for Genome Analysis (YCGA) and assembled and annotated by our group (Sandner-Miranda et al., 2016).

Computing Conservative Consensus Core- and Pan-Genomes

High stringency homologous gene clusters were computed with the GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) software package by imposing a minimum of 90% query coverage on the all-against-all BLASTP results and performing a PFAM-domain scanning on each sequence to ensure that all homologous gene clusters contain the same domain composition and order. Clustering was performed with the BDBH (-e -D), COGtriangles (-G -t 0 -D) and OMCL (-M -t 0 -D) algorithms implemented in GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) and the indicated parameters. A consensus core-genome was computed with the aid of the compare_clusters.pl script (-t 34) from the clusters generated by each of the tree algorithms, as detailed elsewhere (Vinuesa and Contreras-Moreira, 2015). Similarly, a consensus pan-genome was computed from the COGtriangles and OMCL clusters using the '-m -t 0' parameters, to generate the pan-genome matrix reporting clusters of all sizes.

Estimating a Robust Maximum-Likelihood Core-Genome Phylogeny for the Genus *Serratia*

A core-genome phylogeny was estimated under the maximum-likelihood (ML) optimality criterion using the consensus core-genome clusters computed by GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) as described in the previous section and passing them to the GET_PHYLOMARKERS (Vinuesa et al., 2018, in revision) software suite, which was run in default mode (-R 1 -t DNA). The latter is freely available on GitHub¹. Briefly, the GET_PHYLOMARKERS pipeline was used to select core-genome loci with optimal phylogenetic attributes, namely those passing the phi recombination test (Bruen et al., 2006), producing tree topologies and branch-lengths not significantly deviating (kdtrees test) from the expected distribution of these parameters under the multispecies coalescent (Weyenberg et al., 2014) and displaying average branch support values >0.7 (see Vinuesa et al., 2018 for the details). The clustal-omega (Sievers et al., 2011) codon alignments passing these filters were concatenated and

¹https://github.com/vinuesa/get_phylomarkers

a ML phylogeny estimated with IQ-TREE 1.6.1 (Nguyen et al., 2015) using the best fitting model and selecting the phylogeny with the highest likelihood score from those found among independent searches.

Computing Pairwise Core-Genome Average Nucleotide Identity Values From OMCL Clusters (cgANIb-OMCL)

Pairwise cgANIb values were computed from the BLASTN alignments identified by OMCL as belonging to the core-genome with the aid of the `get_homologues.pl` script, run with the '-A -a CDS' parameters. The resulting cgANIb-OMCL matrix was then displayed as an ordered, bi-dimensional heatmap with the aid of the `plot_matrix_heatmap.sh` script, distributed with the GET_HOMOLOGUES package.

Phylogeny of *Serratia* spp. Based on Its Pan-Genome

A parsimony pan-genome phylogeny for the 32 *Serratia* genomes was estimated from the consensus pan-genome matrix of presence/absence data for homologous clusters created with the aid of the `compare_clusters.pl` script from the GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013) package, run with the `-m -t 0 -T` parameters, which calls PARS from the PHYLIP suite. The total number of resistance determinants and the number of acquired and intrinsic resistance genes, including the number of efflux pump genes identified in each genome, are indicated on the tree.

Identification of Antimicrobial Resistance Genes in the *Serratia* Genus

The whole genome for all strains was analyzed using BLASTN to identify ARGs (Camacho et al., 2009). Searches were also made against locally maintained versions of the CARD (a rigorously curated collection of known resistance determinants) (McArthur et al., 2013) and ResFinder (Zankari et al., 2012) databases. Mutations of genes associated with resistance were searched with BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) and MEGA7 softwares (Kumar et al., 2008). We aligned the 32 *Serratia* whole genomes using Mauve 2.4.0 (Darling et al., 2010) in order to enable identification of the chromosomal genes associated with intrinsic antibiotic resistance by sequence homology. Mutations of genes *gyrA* and *gyrB* (resistance to quinolones), *murA* (resistance to fosfomycin) and *folP* (resistance to sulfamethoxazole) were assessed for acquired resistance using BioEdit 7.2.5. In addition, each genome was screened for additional and strain-exclusive ARGs. In order to identify acquired genes on plasmids or integrons, we used BLASTN (Altschul et al., 1990), Mauve 2.4.0. and ISfinder (Siguier et al., 2006).

Relationship Between the Isolation Source of Each *Serratia* Species and Its Resistance Genes Content

We performed a Principal Coordinate Analysis (PCoA) (Gower, 1998) in order to visualize similarities and dissimilarities among

the 32 *Serratia* spp. resistomes and their relationship with their ecology. We grouped the isolation sources of the strains into three main categories: pathogenic, environmental and symbiotic strains. The environmental strains were divided into three sub-groups: environmental strains associated with soil and plants, environmental strains isolated from water and environmental strains isolated from food sources. Analysis was performed for each *Serratia* strain based on antibiotic resistance gene content.

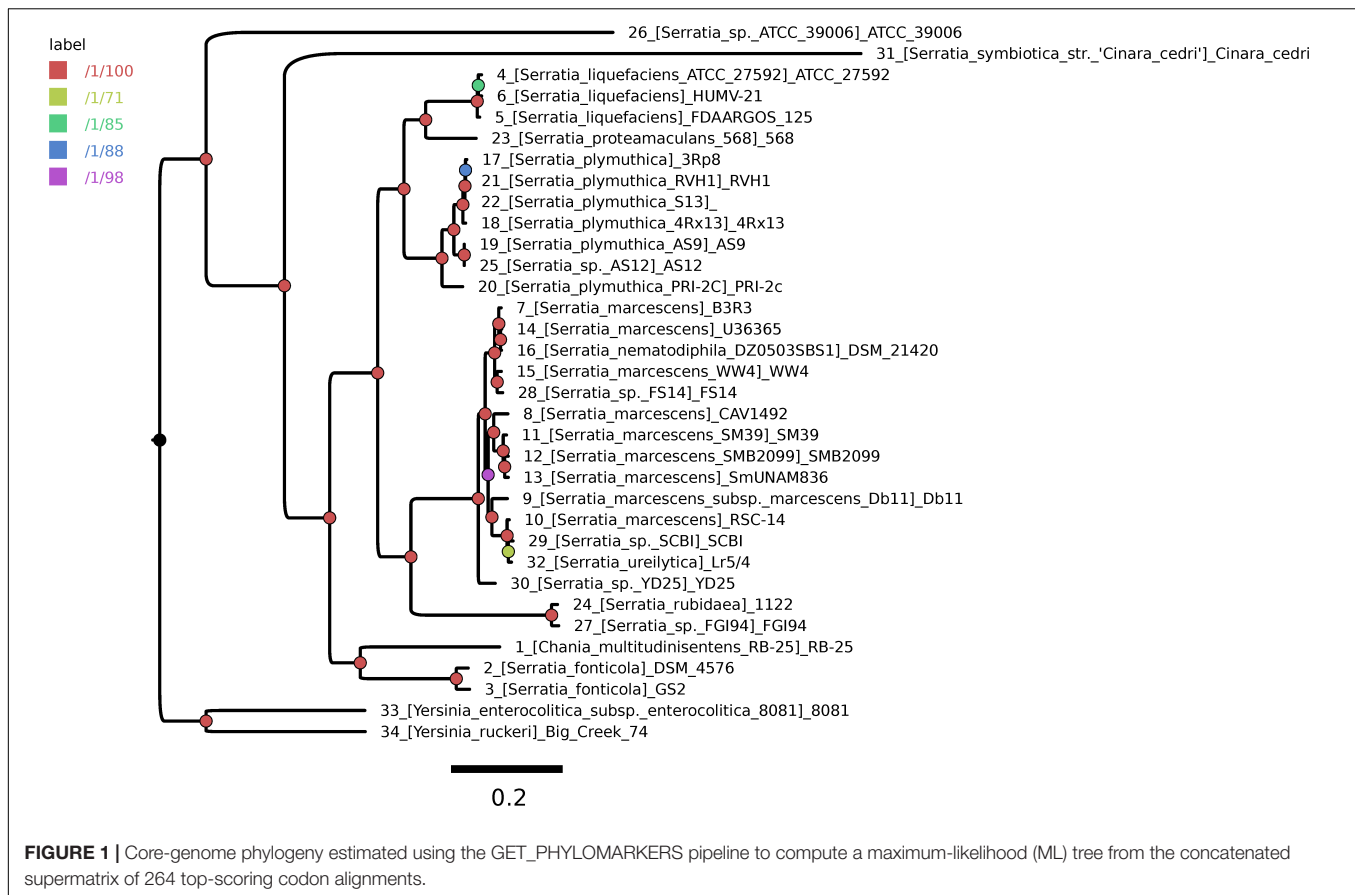
RESULTS

A Robust and Highly Resolved Core-Genome Phylogeny for the Genus *Serratia*

A highly stringent consensus core-genome of 396 genes was computed for the 32 *Serratia* spp. genomes and two *Yersinia* spp. genomes, used as outgroup sequences (Supplementary Figure S1). We used the GET_PHYLOMARKERS pipeline to compute a ML core-genome phylogeny from the concatenated supermatrix of 264 top-scoring codon alignments passing the sequential filters imposed by the pipeline. Figure 1 shows the ML tree estimated under the best-fit GTR+F+ASC+R4 model (lnL score: -1793389.569) and rooted at the branch subtending the clade grouping the two *Yersinia* genomes. The tree is highly resolved, as indicated by the approximate Bayesian and UFBootstrap values computed for each bipartition by IQ-TREE. The two most basal branches of the ingroup clade correspond to environmental (ATCC39006) and endosymbiotic (*S. symbiotica*) organisms. The latter has a strongly reduced genome, containing only 672 CDSs, being also atypical due to its low G+C content, which is only ~ 29%. Seven lineages were resolved further inside the tree, which are consistent with the species-level classification of the genome sequences (numbered branches in Figure 1). However, several taxonomic inconsistencies were identified in the *S. marcescens* clade, which tightly groups *S. nematodiphila* DSM 21420 and *S. ureilytica* Lr5/4 nested within it. In addition, the species-tree presented in Figure 1 strongly supports the classification of strain AS12 as a member of *S. plymuthica*, strains FS14, SCBI and YD25 as members of *S. marcescens* and strain *Serratia* sp. FGI94 as *S. rubidea*. These reclassifications were fully supported by average core-genome identity values (cgANIb) computed from the pairwise BLASTN alignments used by OMCL to cluster the core-genome loci. In all cases these strains had a cgANIb value > 98% when compared to the closest named species (Supplementary Figure S2), as indicated in the previous sentence and shown on the ML species-tree depicted in Figure 1.

Phylogenetic Structure of *Serratia* spp. Pan-Genome and the ARGs Number

The parsimony pan-genome tree was derived from a consensus presence/absence matrix of homologous genes based on the clustering algorithms OMCL and COGtriangles. The Venn diagram shows the number of gene clusters of the 32 *Serratia* spp. pan-genome (12,347 clusters) (Supplementary Figure S3) that were used to generate the pan-genome matrix and the phylogeny.



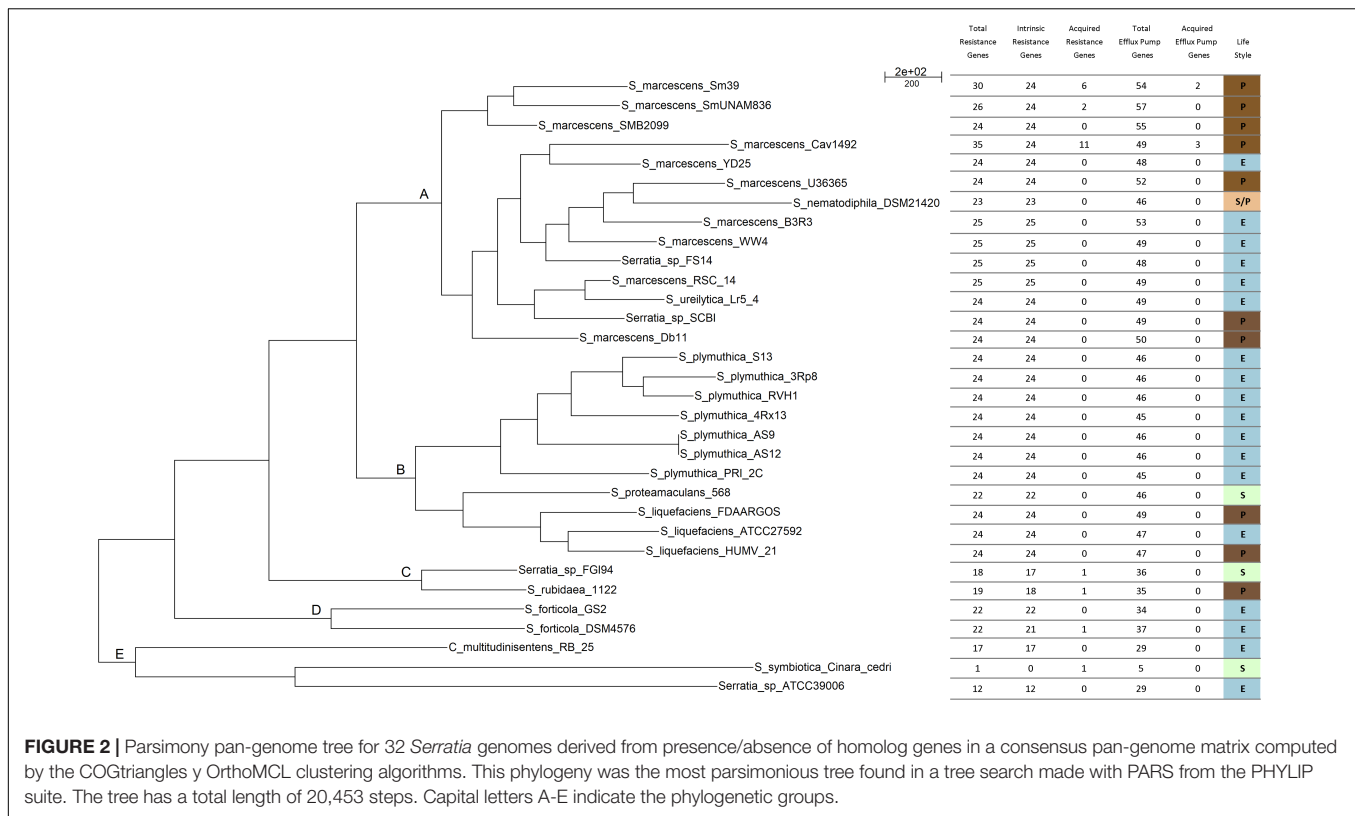
The pan-genome tree shows five main groups (Figure 2). The results of the phylogenetic analysis placed all the *S. marcescens* strains in group A, together with the misclassified *S. ureilytica*, an environmental strain from a geothermal spring and *S. nematodiphila* DSM 21420, a nematode symbiont and an insect pathogen and 3 uncharacterized strains: *Serratia* sp. YD25, *Serratia* sp. FS14 and *Serratia* sp. SCB1. All these strains should be re-classified as *S. marcescens*, based on the evidence gained from the core-genome phylogeny (Figure 1) and the cgANIb data (Supplementary Figure S2). Most of the acquired ARGs and efflux pump genes are found in strains of this group. Group B consists of two sub-groups: one with the strains belonging to all *S. plymuthica* strains; and the other with the *S. liquefaciens* and *S. proteamaculans* strains, which are all environmental strains, with the exception of *S. liquefaciens* HUMV-21 and *S. liquefaciens* FDAARGOS 125, which are both nosocomial strains. Group C comprises only two strains, *Serratia* sp. FGI94, a fungus symbiont and *S. rubidaea* 1122 isolated from a patient in China. The former has a cgANIb value of 99.2 when compared to the latter, and hence strain FGI94 should be classified as *S. rubidaea*. *S. fonticola* GS2 and *S. fonticola* DSM4576 are placed in group D, both environmental strains. Finally, group E, holds 3 distantly related strains: *Chania multitudinisentens* isolated from the soil of an ex-landfill site; *Serratia* sp. ATCC 39006 isolated from water; and the co-obligate aphid symbiont, *S. symbiotica* 'Cinara Cedri'. The genomes of these 3 strains harbor the fewest ARGs on their

chromosomes. Their cgANIb values are <85% with respect to the other species in the main *Serratia* spp. cluster, and therefore their classification as members of the former genus is questionable.

Phylogenetically, *S. marcescens* SmUNAM836 and *S. marcescens* SM39 are closely related with both genomes sharing the same intrinsic ARGs and efflux pump genes (Iguchi et al., 2014) but different acquired ARGs.

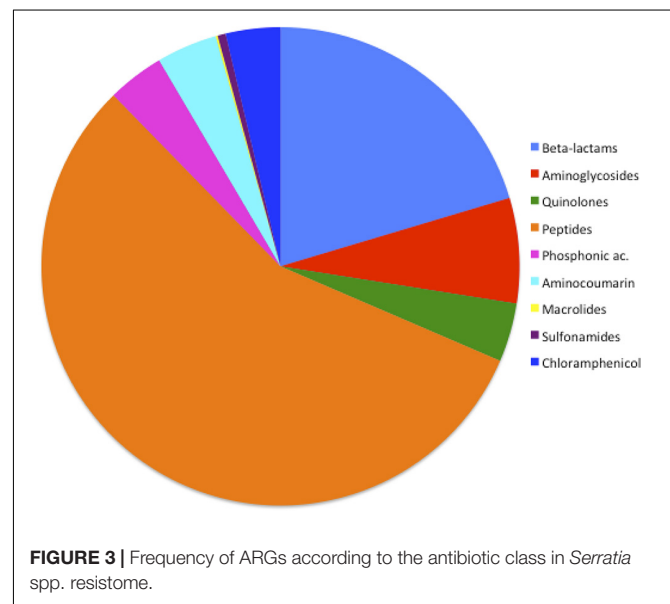
Identification of Antimicrobial Resistance Genes in the 32 *Serratia* spp. Genomes

Using the CARD database, we looked for ARGs reported to be associated with enterobacteria and more specifically with *Serratia* spp., which were identified on the genomes of the *Serratia* spp. strains using BLASTN. We then aligned the 32 genomes using Mauve 2.4.0 and performed BLASTN to look for the percentage of identity and coverage between the different ARGs. The sequence alignments showed that those genes that appeared to be homologous in Mauve, shared more than 70% of identity between them when performing BLASTN; this, together with the use of global multiple sequence alignments, makes our identification of ARGs more robust (Pearson, 2013). Strain specific ARGs and efflux pump components were detected running a blast search against the CARD database using the following parameters: coverage = 95/90% and identity = 70/50%, respectively.



Frequency of ARGs According to Each Class of Antibiotic in the *Serratia* spp. Resistome

The general frequency of ARGs found in the 32 *Serratia* spp. genomes (efflux pumps not included in this analysis) according to the class of antibiotic was: 0.13% for macrolides; 0.54% for sulfonamides; 3.69% for chloramphenicol; 3.83% for phosphonic antimicrobials; 3.96% for quinolones; 4.1% for aminocoumarin antibiotics (novobiocin); 7.11% associated with aminoglycoside resistance; 20.38% for β -lactam, 56.22% for antimicrobial polypeptides (Figure 3). It is not surprising that the highest frequency of ARGs corresponded to the genes that confer resistance to polypeptide antibiotics since *S. marcescens* and the whole genus has a natural resistance to polymyxin B (Olaitan et al., 2014). The second highest frequency in our sample corresponded to β -lactam resistance genes. This fact was expected due to the high number of β -lactamases acquired through HGT in plasmids or transposons found in this genus. The importance of β -lactam resistance genes is reinforced with the fact that up to 1,000 genes related to β -lactam resistance have been described and classified in recent years, among them many new alleles and new genes found in remote geographical niches (Allen et al., 2009; Bush and Jacoby, 2010). In our analysis, the fact that the β -lactamases acquired on plasmids were found exclusively in nosocomial bacteria, except for *bla*_{ACT-28}, which was identified in an environmental strain associated with plants, is a noteworthy observation (Supplementary Table S3). HDT has been shown to play a major role in the transmission and evolution



of β -lactam resistance genes in pathogenic and environmental enteric bacteria (Davies and Davies, 2010; Iredell et al., 2016).

Total Antibiotic Resistance Genes

A total of 123 different classes of genes associated with intrinsic and acquired antibiotic resistance were found among the 32 *Serratia* species (detailed information is shown in

Supplementary Table S2). These ARGs include genes that encode modifying enzymes, antibiotic hydrolysis enzymes, efflux pumps, porines, regulatory proteins, genes with mutations that confer antibiotic resistance, and alleles of some genes and efflux pumps. From the 123 total resistance genes: 33 are intrinsic resistance genes; 16 are acquired resistance genes [13 on plasmids (**Supplementary Table S3**), 2 on transposons, and the gene *gyrA* with the Ser83 mutation that confers quinolone resistance] (**Figure 4**); and 74 are genes associated with efflux systems, from which 3 were localized on plasmids (**Figure 5**).

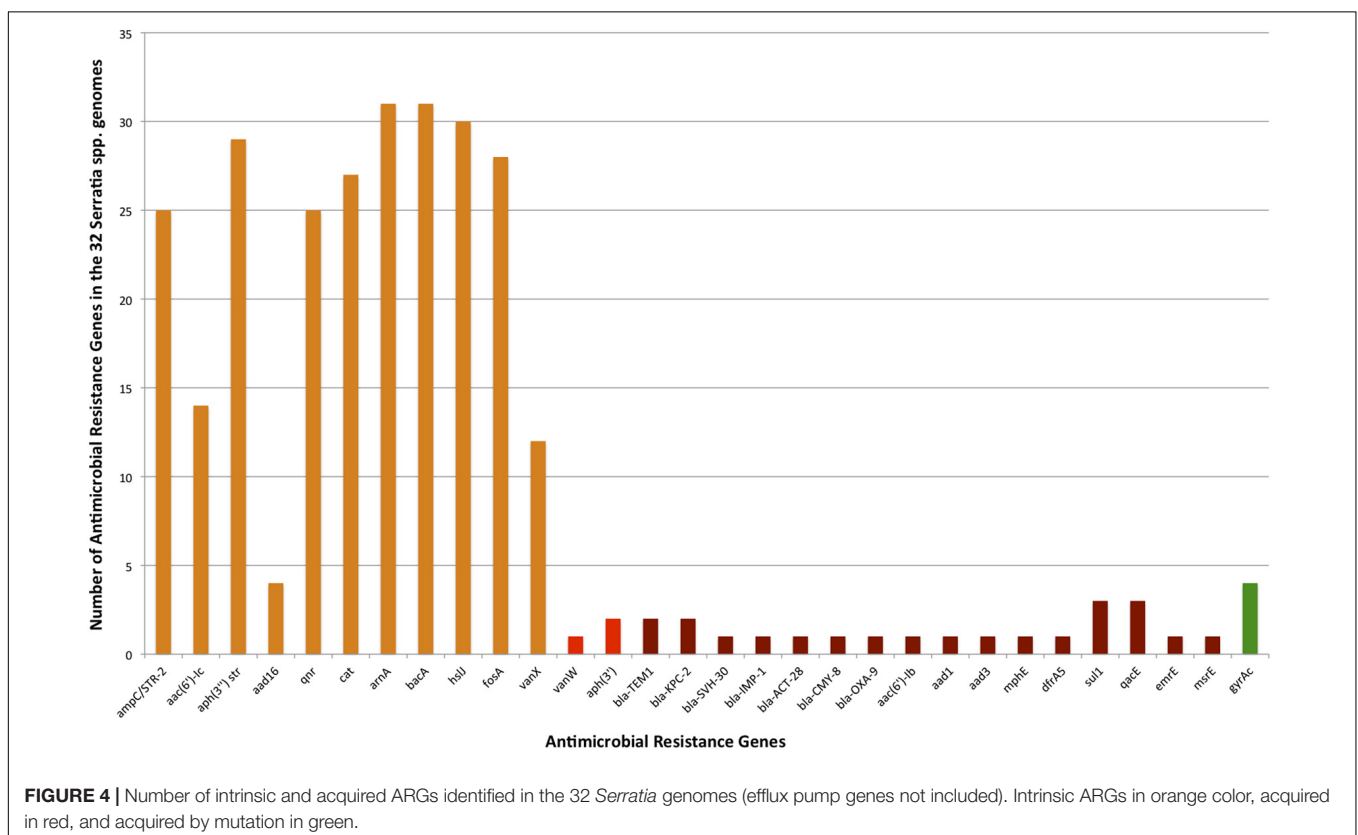
Intrinsic Resistance Genes

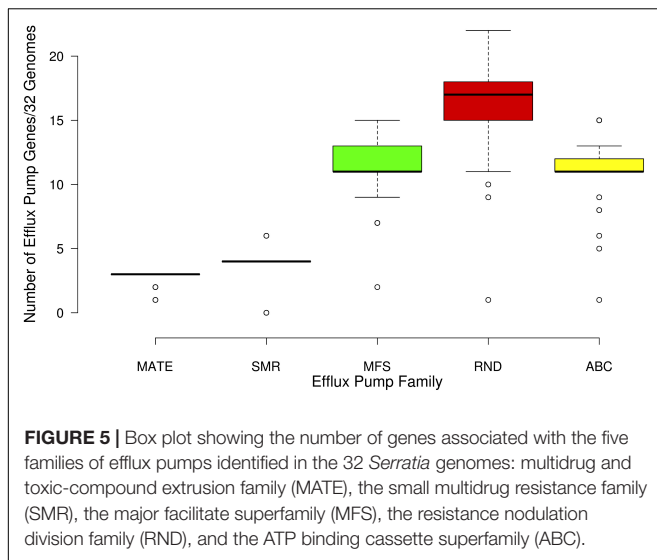
Intrinsic resistance comprises all of the inherent properties provided by the characteristics of a particular microorganism that limit the action of antimicrobials (Fernández and Hancock, 2012). Most of the genes related to antimicrobial resistance are encoded on the chromosome of the *Serratia* genus. In most genomes, we identified the Ambler class C β -lactamase gene *ampC*, which confers resistance to all penicillins, as well as to 3rd generation cephalosporins and aztreonam when overexpressed (Paterson and Bonomo, 2005), in addition, we found all its regulatory genes: *ampD*, *ampE*, *ampG*, and *ampR* (MacDougall, 2011). A class A β -lactamase gene *bla_{CTX-M}* and class C β -lactamase gene *bla_{ACT-29}* were found only in the two *S. fonticola* genomes. Of the 14 ARGs associated with β -lactam resistance, 10 were found in *S. marcescens* CAV1492, a nosocomial strain (**Supplementary Table S2**).

Three aminoglycoside resistance genes, the aminoglycoside phosphotransferase gene *aph(3'')*, which confers resistance to streptomycin, and the aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-Ic* to amikacin and tobramycin (Shaw et al., 1992) were present on most of the chromosomes studied. We found the aminoglycoside nucleotidyltransferase gene *aadA16* in only 4 genomes from environmental strains. *S. symbiotica*, and *C. multitudinisentens* RB-25 did not present any of these genes.

We identified the *qnr* gene that confers quinolone resistance in the chromosome of 25 strains. Six different alleles of this gene were identified: allele *qnrB15* in the *S. phymutica* group, allele *qnrB23* in the *S. marcescens* and *S. nematodiphila* group, *qnrB31* also in the *S. marcescens* group, *qnrB32* in the *S. liquefaciens* and *S. proteamaculans* group, *qnrB37* in the *S. marcescens* and *S. ureilytica* (reclassified as *S. marcescens*) group, and *qnrB57* in the rest of the *S. phymuthica* strains. Due to the fact that this gene is unique to the *Serratia* spp. chromosome, it could be the possible source of Qnr determinants for the plasmid-encoded Qnr in other species of bacteria (Velasco et al., 2009).

Serratia spp. is intrinsically resistant to polymyxin B. Polymyxin B resistance in this genus can be explained by the presence of the *arnBCADTEF* operon, the two-component systems *pmrAB/phoPQ* and the regulatory gene *mgrB* in all strains, except for *S. symbiotica* 'Cinara Cedri'. Activation of the two-component systems is set off by environmental stimuli that result in an overexpression of LPS-modifying genes (Lin et al., 2014; Olaitan et al., 2014) and leading to polymyxin B and colistin resistance.





Besides the above mentioned antibiotics, the genus *Serratia* is intrinsically resistant to other classes of antibiotics: 31 out of 32 strains have the *bacA* gene on their chromosomes, conferring resistance to bacitracin, another polypeptide antibiotic. In addition, 30 strains harbor the gene *hslJ* and 28 strains the gene *fosA*, which confer novobiocin and fosfomycin resistance, respectively. The chloramphenicol acetyltransferase *cat* gene, which confers resistance to chloramphenicol is also present in 27 strains (Potrykus and Wegrzyn, 2001; Schwarz et al., 2004). Only 12 strains, mostly environmental, possess the vancomycin resistance gene *vanX* on its chromosome (detailed information is shown in **Supplementary Table S2**).

Intrinsic Resistance Conferred by Efflux Pumps

Active drug extrusion outside of the bacterial cell is one of the most common mechanisms associated with resistance. We identified 74 different genes related to the 5 efflux pump families: the multidrug and toxic-compound extrusion family (MATE), the small multidrug resistance family (SMR), the major facilitator superfamily (MFS), the resistance nodulation division family (RND), and the ATP binding cassette superfamily (ABC) (**Supplementary Table S2**).

Some of these efflux pumps have been described previously in the *Serratia* genus and have homolog in other bacteria: the SsmE efflux pump of the SMR family (conferring resistance to ethidium bromide) is homologous to the *E. coli* EmrE (Minato et al., 2008); SmfY of the MFS family (conferring resistance to norfloxacin, acriflavine and ethidium bromide) homologous to QacA of *Staphylococcus aureus* (Shahcheraghi et al., 2007); SdeXY (conferring resistance to erythromycin, tetracycline, norfloxacin, benzalkonium chloride, ethidium bromide, acriflavine, and rhodamine); SdeAB (conferring resistance to fluoroquinolones) and SdeCDE (conferring resistance to novobiocin) all belonging to the RND family and having a high degree of homology with the AcrAB-TolC, OqxAB and MdtABC efflux pumps of *E. coli*

respectively (Chen et al., 2003; Kumar and Worobec, 2005; Begic and Worobec, 2008); and finally, SmdAB (conferring resistance to norfloxacin, tetracycline, and tetraphenylphosphonium chloride) of the ABC superfamily, an homolog of MdlAB of *E. coli* (Matsuo et al., 2008).

Other homologous genes of efflux systems from different bacteria that confer resistance to several kinds of antibiotics and antiseptics were identified on the 32 genomes: 2 alleles of the aminoglycoside efflux pump AcrD from the RND family (Rosenberg et al., 2000); 2 quinolone efflux pumps, DinF and MdtK, from the MATE family (Brown et al., 2007); Suge, a SMR family efflux pump which confers resistance to quaternary ammonium compounds (Chung and Saier, 2002); SgeE, a MSF family efflux pumps, among them two alleles of EmrAB conferring resistance to thiolactomycin (Furukawa et al., 1993), Bcr to bacitracin (Bernard et al., 2005), Fsr, an homolog of *E. coli* RosA, which confers fosmidomycin resistance, and MdfA, which confers resistance to chloramphenicol (Heng et al., 2015). The efflux pump MacAB from the ABC superfamily, which confers resistance to macrolides (Lu and Zgurskaya, 2012; Fitzpatrick et al., 2017) was also identified on the chromosomes of the *Serratia* spp. genomes, and the efflux pump TetA from the MFS family conferring resistance to tetracycline (Aldema et al., 1996). In addition, 16 genes belonging to 8 efflux systems had alleles on different chromosomal loci, including copies on genomic islands, for example, the aminoglycoside efflux protein AcrD, a transporter belonging to the resistance-nodulation-division family (RND family), which has three different alleles (*acrD*, *acrD'*, and *acrD''*) distributed among the 32 *Serratia* genomes. The nucleotidic identity percentage between *acrD* and *acrD'* is 67.2%, while it is 60.9% between *acrD* and *acrD''* and 62.6% between *acrD'* and *acrD''*. Two of the nosocomial strains, SmUNAM836 and Sm39, were the only strains that presented all three alleles.

The majority of the genes associated with efflux pumps of the 32 genomes belong to the RND efflux family (**Figure 5**). Most of these genes are shared by all the strains, except for *S. symbiotica* 'Cinara Cedri' that only contains 5 of the reported 74 efflux pumps genes. It is not surprising that this strain harbors very few ARGs and efflux pumps because of its reductive genome evolution related to its lifestyle inside the stable and protected niche of the host cell of the aphid *Cinara cedri* (Lamelas et al., 2011; Dutta and Paul, 2012). The highest number of efflux pump genes (57) is present in the Mexican nosocomial strain *S. marcescens* SmUNAM836 sequenced by our group (Sandner-Miranda et al., 2016). Pathogenic strains, including nosocomial strains, show an average number of 50.1 efflux-associated genes, whereas the environmental strains show an average of 44.1 efflux-associated genes and the symbiotic strains only 33.5 efflux-associated genes (**Supplementary Table S2**).

Acquired Resistance Genes on Plasmids, Transposons, and Integrons

In order to identify genes associated with acquired antibiotic resistance, we screened all the plasmids of the 32 *Serratia* spp. strains. A total of 16 plasmids are reported in the NCBI

database for this strain collection (**Supplementary Table S3**). We found 13 plasmid-borne ARGs, 7 β -lactam resistance genes, 3 aminoglycoside resistance genes encoding modifying enzymes, one macrolide resistance gene, one sulfonamide resistance gene, one trimethoprim resistance gene and additionally 3 efflux pump genes associated with resistance to quaternary ammonium compounds, disinfectants and macrolides also on plasmids.

The β -lactam resistance genes class A *bla*_{TEM-1}, *bla*_{KPC-2} and *bla*_{SVH-30}, class B *bla*_{IMP-1}, class C *bla*_{ACT-28} and *bla*_{CMY-8}, and class D *bla*_{OXA-9} were identified in plasmids of nosocomial strains, with the exception of *bla*_{ACT-28}, a class C β -lactamase found on plasmid pSF001 of *S. fonticola* GS2, a strain that is associated with a plant. Looking at the nosocomial strains *S. marcescens* SmUNAM836 and *S. marcescens* CAV1429, its plasmids (pSmUNAM836 and pKPC_CAV1492 respectively) harbor class A *bla*_{TEM-1} β -lactamase, which is classified as a broad spectrum β -lactamase (Bush and Jacoby, 2010) and confers resistance to all penicillins and β -lactamase inhibitors. The strain *S. marcescens* CAV1429 also carries two copies of the class A β -lactamase, namely *bla*_{KPC-2}, a carbapenemase (Wang et al., 2014), and the *bla*_{OXA-9} gene that encodes an oxacillinase-carbenicillinase (Bojorquez et al., 1998) on plasmid pKPC_CAV1492. The *bla*_{SVH-30} gene, which encodes an ESBL that confers resistance to penicillins and cephalosporines (Bradford, 2001), was located on plasmid pCAV1492-73 of strain *S. marcescens* CAV1492. The imipenem metallo- β -lactamase gene, *bla*_{IMP-1}, and the cephalosporin resistance gene, *bla*_{CMY-8}, were only found on the plasmid pSMC1 of the nosocomial strain *S. marcescens* Sm39.

The aminoglycoside resistance genes *aac*(β')-1b and *aadA1*, encoding modifying enzymes tobramycin and amikacin β' acetyltransferase (Rather et al., 1992) and a streptomycin 3''-adenylyltransferase were found on plasmid pKPC_CAV1492 of the nosocomial strain *S. marcescens* CAV1429. Gene *aadA2*, encoding another streptomycin 3''-adenylyltransferase was found on plasmid pSMC1 of the nosocomial strain *S. marcescens* Sm39. Strain *S. marcescens* Sm39 harbors two copies of the sulfonamide resistance gene *sul1* on plasmid pSMC1.

Three efflux pump genes, *qacE*, *qacH*, and *msrE*, were found on plasmids of the nosocomial strain *S. marcescens* CAV1492. Two copies of gene *qacE* were found on plasmid pSMC1 of *S. marcescens* SM39. These efflux pumps confer resistance to quaternary ammonium compounds, disinfectants and macrolides, respectively.

As previously reported, it is common to find various ARGs on the same mobile element. Such is the case of the genes *sul1*, *qacE* and some β -lactamases, which are found together in the clinical class 1 integron (Wyrsch et al., 2016). In this study we found two plasmids harboring this integron, plasmid pSMC1 of the nosocomial strain *S. marcescens* Sm39 and plasmid pKPC_CAV1492 of the nosocomial strain *S. marcescens* CAV1492. The class 1 integron is associated with various families of transposons, the Tn3 transposon present in plasmid pKPC_CAV1492 (Deng et al., 2015) and the Tn91 transposon present in plasmid pSMC1. Other plasmids harboring heavy metal resistance are also present in some of the *Serratia* spp. genomes (mercury resistance genes in plasmid pCAV1492-73

and pSMC1 from the nosocomial strains *S. marcescens* CAV1492 and *S. marcescens* Sm39, respectively, and copper resistance genes in plasmid pCAV1492-199 also from strain *S. marcescens* CAV1492).

The aminoglycoside phosphotransferase gene, *aph*(3'), was only found on *S. rubidaea* 1122 and *Serratia* sp. FGI94 chromosomes, associated with a transposon. Gene *vanW*, which confers resistance to vancomycin, was found on a transposon of the environmental strain *S. fonticola* DSM4576. These mobile elements have not been previously classified and were inferred in this analysis on the basis of being unique sequences harboring transposases (**Supplementary Table S2**).

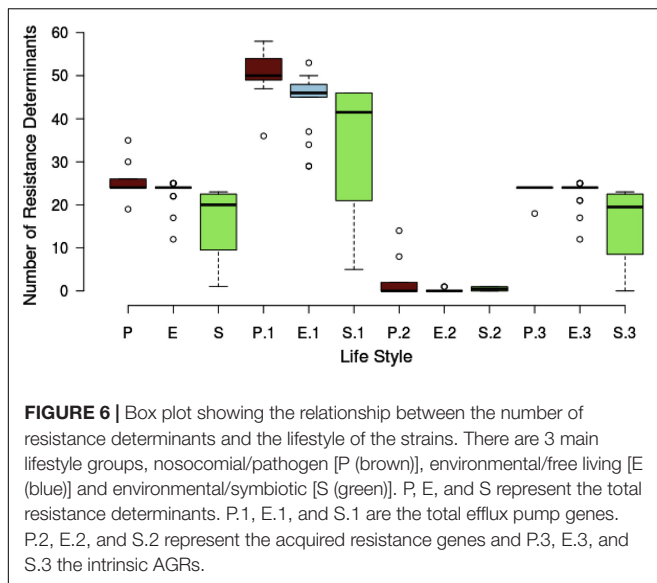
Many other genes encoding transposases and integrases were found on all *Serratia* spp. chromosomes, but neither associated with ARGs.

Efflux Pumps Acquired on the Genomic Islands of *Serratia* spp.

Three efflux pumps were identified on different genomic islands of some of the *S. marcescens* strains using IslandViewer 4 (Bertelli et al., 2017). These genomic islands have not been characterized before. Two of them, MexGHI (Aendekerker et al., 2005) and MexPQ-OprE (Mima et al., 2005), which confer resistance to norfloxacin and macrolides, respectively, showed 82 and 84% homology to the *P. aeruginosa* efflux pumps, indicating a probable horizontal transfer event between these bacteria. The third efflux pump was an allele of *etsABC* that encodes an *E. coli* efflux pump of a putative ABC transport system contained within the pAPEC-O2-ColV plasmid, that confers resistance to macrolides (Johnson et al., 2006). These efflux pumps are also present in other *Serratia* species and most probably on genomic islands as well (**Supplementary Table S2**).

Resistance Acquired by Gene Mutations

The gene *gyrA* mutation at codon Ser83 was identified in three nosocomial strains, namely *S. marcescens* SmUNAM836, *S. marcescens* Sm39, and *S. marcescens* CAV1492, and also on *S. symbiotica* 'Cinara Cedri,' an aphid symbiont. Resistance may arise due to point mutations that result in amino acid substitutions within the topoisomerase genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), with or without a decreased expression of outer membrane porins and overexpression of multidrug efflux pumps (Hopkins et al., 2005). *S. marcescens* SmUNAM836 and *S. marcescens* CAV1492 had an isoleucine residue instead of the expected serine at position 83 of GyrA while the strain *S. marcescens* Sm39 had an arginine residue. *S. symbiotica*, which is a co-obligate symbiont, had a threonine in this position. These mutations are likely to induce a local conformation change of the A subunit of the DNA gyrase, modifying the binding affinity of the quinolones for this enzyme (Yoshida et al., 1990; Weigel et al., 1998). Resistance to one type of quinolone will confer resistance to all (Webber and Piddock, 2001). Neither of the strains had the mutation on gene *folP* that confers resistance to sulfamethoxazole. The *folP* single C→T transition resulting in a Pro→Ser substitution at amino acid position 64 is absent in all genomes (Vedantam et al., 1998). Amino acid substitutions (Asp369Asn and Leu370Ile) in MurA



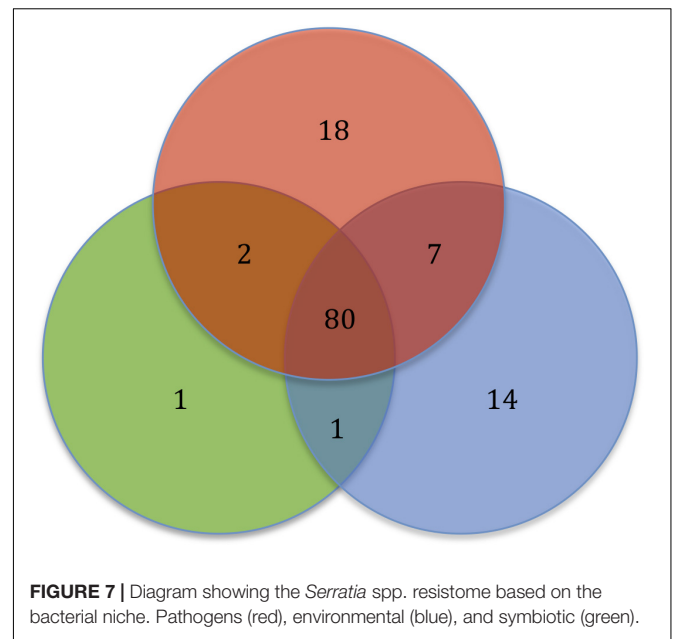
are a major factor in fosfomycin resistance, but neither of the strains showed these mutations (Takahata et al., 2010).

The *Serratia* spp. Resistome

We classified the resistome according to the niche or lifestyle of the bacteria. We divided the sample of 32 *Serratia* spp. strains into three lifestyles: pathogens (nosocomial and animal pathogens), environmental (bacteria associated with plant, soil, water, or food) and symbiotic bacteria (Figure 6). The diagram shows that pathogenic (brown) and environmental strains (blue) do not show a significant different median number of total ARGs, intrinsic and acquired, but symbiotic bacteria (green) do show the smallest number. Regarding efflux pump genes, pathogenic bacteria harbor more of these genes than environmental and symbiotic bacteria. We can appreciate that the difference among resistance gene content between nosocomial/pathogenic and environmental strains is not significant. We believe that this is due to the environment providing a natural reservoir for ARGs.

In this comparative genomic study, we report that the *Serratia* spp. resistome consists of genes shared by the majority of the strains and genes exclusive of niche. With the analysis of 32 *Serratia* spp. genomes, we report a resistome for the *Serratia* genus totaling 123 ARGs, 49 intrinsic and acquired ARGs, and 74 efflux pump-associated genes. Of the 123 ARGs, 80 are present in one or more strains from each niche, 7 are shared by pathogens and environmental strains only, 2 are shared by pathogens and symbiotic strains, and one is shared by environmental and symbiotic strains. 18 ARGs were found exclusively in pathogenic strains, 14 in environmental strains and one in symbiotic strains (Figure 7).

The polymyxin resistance operon and the genes *catA*, *bacA*, *fosA* and *hslJ*, which confer resistance to chloramphenicol, bacitracin, fosfomycin and novobiocin, respectively, are among the shared ARGs. In addition, the aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(6′)-Ic*, the aminoglycoside phosphotransferase gene, *aph(3′′)*, and the quinolone resistance

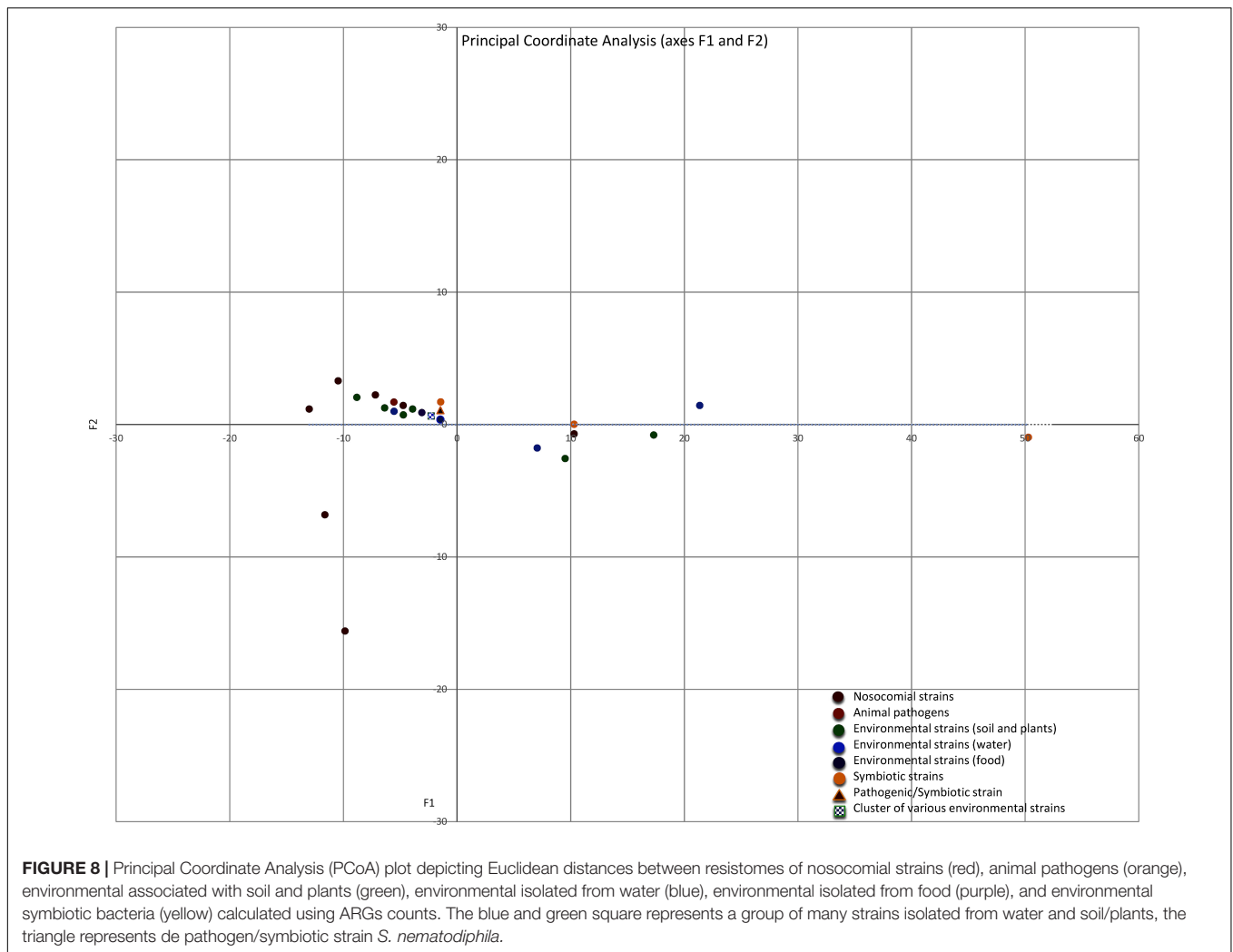


gene, *qnr*, are shared by the majority of the strains, regardless of their lifestyles. The class C β -lactamase gene, *ampC*, and all the regulatory genes were also found in most of the strain chromosomes. Most of the strains share most of the genes associated with efflux systems.

The 18 ARGs exclusive of pathogens are genes located on plasmids, mainly β -lactamase coding genes, with the exception of the alleles of the efflux pumps *EmrAB* and *AcrD*, which are located on the chromosome (Supplementary Table S2). The 14 ARGs exclusive of environmental strains are genes found on the chromosome, all of intrinsic resistance except for the vancomycin resistance gene *vanW* found on a transposon. Only one ARG was found to be exclusive of a symbiotic strain, an allele of the efflux pump *AcrF* that confers resistance to ciprofloxacin. Five efflux pumps genes, *mexP*, *mexQ*, *opmE* and *triC*, from the RND family conferring resistance to macrolides, fluoroquinolones and triclosan, respectively, and the gene *mdsC*, which is part of the efflux pump *MdsAB* (absent in this sample), are shared by pathogen and environmental strains. The aminoglycoside phosphotransferase gene *aph(3′)* and the mutation of *gyrA*, which confers resistance to quinolones, were located in pathogens and symbiotic strains. Only the streptogramin efflux pump gene, *vgaC*, is shared by environmental and symbiotic strains and is absent in pathogens.

Similarities and Dissimilarities Between the *Serratia* spp. Resistomes

The intrinsic and acquired ARGs, and the efflux pump-associated genes, which were identified in the 10 *Serratia* species and in the 4 non-characterized strains, were grouped according to the lifestyle of each strain in a matrix of similarity/dissimilarity. A PCoA analysis was performed to visualize the similarities of the *Serratia* spp. resistomes according to the 3 previously mentioned ecological niches. The environmental strains were



sub-divided into strains associated with soil and plants, strains isolated from water and strains isolated from food. The plot of Euclidean distances shows that the resistomes of nosocomial and pathogenic strains are similar to those isolated from the natural environment based on the number of ARGs (Figure 8). The most dissimilar resistome was from the co-obligate aphid symbiont, followed by the resistome of strain *Serratia* sp. ATCC 39006 isolated from salt marsh water and a questionable member of the genus *Serratia*, the resistome of the fungus garden symbiont *Serratia* sp. FGI94 (reclassified in this work as *S. rubidea*) and the resistome of *C. multitudinisentens* RB-25 isolated from soil. Nosocomial strains with the highest number of acquired ARGs, *S. marcescens* Sm39 and *S. marcescens* CAV1429, also showed dissimilarity with respect to the others. It is not surprising that nosocomial strains present the highest number of acquired ARGs as they are subject to a strong selection pressure due to frequent antibiotic use in hospitals.

It would be interesting to include a new set of *Serratia* isolates to be collected from animal and environment sources that could confirm the selection pressure of the indiscriminate use of antibiotics in the hospital environment on nosocomial

strains and address unsolved issues on the zoonotic origin of antimicrobial resistance genes (Cloeckaert et al., 2017).

DISCUSSION

The microbial pan-genome is the cumulative number of different genes found within genomes of a particular taxonomic rank, usually within a species, though this can be extended to higher levels, such as a genus (Tettelin et al., 2008). It contains the core genes, common to all strains of the study, the accessory genome containing genes present between two and $n-1$ strains, and the unique or singleton genes present only in a single strain. Inside the pan-genome, we can study different features, such as the resistome (Rouli et al., 2015). The pan-genome size, and whether it is open or closed, depends in part on bacterial lifestyle. Large and open pan-genomes are associated with bacterial species that live within communities and that are prone to horizontal gene exchange. However, the more genomes used to predict the pan-genome, the larger its predicted size, due to the contribution of rare genes (Tettelin et al., 2008).

Here, we report an observed pan-genome of 12,347 clusters of genes for a collection of 32 strains of the genus *Serratia*, which we consider a relatively large pan-genome based on the small sample size of this genus. It is also considered to be relatively large when compared to the pan-genome of 5,398 clusters for 50 *Streptococcus* genomes from 14 species (Contreras-Moreira and Vinuesa, 2013), and around 10,000 family genes for the *Salmonella* genus (Jacobsen et al., 2011). On the other hand, for the genus *Vibrio*, there is a report of a pan-genome consisting of 26,504 genes for 43 different species (Thompson et al., 2009), which is a very large pan-genome and reflects the high diversity of this genus. For the small genome of genus *Mycoplasma* there is an estimate of a pan-genome consisting of 8,000 genes, which is very large if we consider the small genome size (0.5 and 1.4 Mb) of this genus; this huge pan-genome size may be the reflection of their diverse lifestyles (Liu et al., 2012). Large pan-genomes indicate that these genomes have a considerable amount of unique sequences, such as mobile elements, genomic islands, transposons or prophages.

The phylogenetic analysis based on the pan-genome of the 32 *Serratia* spp. is perfectly supported by our maximum likelihood core-genome phylogeny. All *S. marcescens* strains group together with the uncharacterized strains *Serratia* sp. YD25, *Serratia* sp. FS14 and *Serratia* sp. SCB1, suggesting that they should be reclassified as members of the *S. marcescens* species. This is clearly supported by our cgANIb estimates which are >98% in all cases. It is worth noting that *S. nematodiphila* DSM 21420 clusters in the same subgroup as *S. marcescens* Db11 and *Serratia* sp. SCB1, which are both insect pathogens. This fact can be explained due to the dual quality of *S. nematodiphila*, which is a nematode symbiont, but a pathogen of the insect that is parasitized by the nematode (Kwak et al., 2015). The evidence presented in this study from the core-genome phylogeny and cgANIb analyses strongly suggest that strains DSM 21420 and SCB1 should be reclassified as *S. marcescens*. *S. phymuthica*, *S. liquefaciens* and *S. proteamaculans* strains are placed in the sister group to *S. marcescens* strains. Two of the *S. liquefaciens* strains are nosocomial pathogens. This grouping is congruent with previous studies (Abebe-Akele et al., 2015; Li et al., 2015). *Serratia* sp. FGI94, which is a fungus symbiont strain and *S. rubidaea* 1122 isolated from a patient in China are placed together in group C. The evidence from the core-genome phylogeny and cgANIb data clearly indicate that FGI94 belongs to the *S. rubidaea* species and that it is wrongly classified. Both have similar chromosome size and harbor the aminoglycoside phosphotransferase gene *aph(3')* on a transposon. The most distantly related strains are *C. multitudinisentens* [recently reclassified as *C. multitudinisentens* (Ee et al., 2016)] isolated from the soil of an ex-landfill site, *Serratia* sp. ATCC 39006 isolated from water and the co-obligate aphid symbiont *S. symbiotica* 'Cinara Cedri'. The genomes of these 3 strains harbor the fewest ARGs on their chromosomes. Based on their <85% cgANIb values when compared to the other *Serratia* genomes, their classification in this genus should be carefully revised.

Bacterial antimicrobial resistance occurs by one or a combination of different mechanisms: a reduction in antibiotic

passage through the bacterial outer membrane preventing access to the target; modification of antibiotic targets by modifying enzymes; antibiotic hydrolysis; and increased transport of the antibiotic out of the cell by efflux pumps (Shaikh et al., 2015; Munita and Arias, 2016). The modulation of resistance to certain antibiotics depends also on the activation of regulatory genes, mutations of specific genes, intrinsic differences in the structure of the outer membrane, such as porin alterations that reduce the entry of antimicrobials, such as carbapenems (Gupta et al., 2011), or due to the acquisition of novel resistance genes by HGT (Blair et al., 2014). It is important to recognize that the concept of antimicrobial resistance is a phenomenon with many layers of complexity. Due to this complexity, a resistance genotype does not necessarily produce a resistant phenotype all the time; an example of this is illustrated with the *aac(6')-Ic* gene. The *aac(6')-Ic* gene was cloned from *S. marcescens* (Shaw et al., 1992) and DNA hybridization analysis demonstrated that all *S. marcescens* strains carried the *aac(6')-Ic* gene, however, not all presented the AAC(6')-Ic resistance profile (Shaw et al., 1993). In this comparative study, we looked for all classes of genes involved in the different antibiotic resistance mechanisms mentioned above, including regulatory genes (detailed information is shown in **Supplementary Table S2**).

The resistome of *Serratia* spp. is composed mainly by intrinsic resistance genes (structural), mostly by genes encoding efflux pumps systems. These pumps, besides conferring resistance to antibiotics, have other important physiological roles and therefore, have greater clinical relevance than is usually attributed to them (Pidcock, 2006). These groups of bacteria harbor a "natural" resistance to most of the antibiotics, such as the β -lactam family, due to the presence of the β -lactamase AmpC (Jacoby, 2009), to polypeptide antibiotics through the operon *arn*, and to quinolones by having the gene *qnr*. This resistance to a wide spectrum of antimicrobials makes it difficult to select an appropriate treatment for *Serratia* spp. infections. Surprisingly, the *Serratia* genus lacks resistance genes for trimethoprim and sulfonamides (with the exception of *S. marcescens* CAV1492 which has acquired the trimethoprim and sulfonamide resistance genes *dfr5* and *sul1* on one of its plasmids, and *S. marcescens* Sm39 which harbors the sulfonamide gene *sul1* on plasmid pSMC1). *Serratia* genomes also lack the *folP* mutation in position 64 that results in a Pro→Ser aminoacid substitution and that confers sulfonamide resistance (Vedantam et al., 1998), which makes this combination of antibiotics a good choice in the treatment of bacterial infections caused by this genus. One evolutionary hypothesis for the lack of these resistance genes in this genus could be based on the antibiotic resistance cost. Resistance is often associated with reduced bacterial fitness and the reduction in antibiotic use will benefit the fitter susceptible bacteria (Andersson and Hughes, 2010). The combination of these antimicrobials has been suspended in many countries relaxing the selection pressure on these genes and leading to gene loss. An alternative hypothesis could be that this genus is intrinsically susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole and that they have never carried these genes on their chromosomes. The presence of

these ARGs on the plasmids of two nosocomial *S. marcescens* strains can be explained by HGT events and by genetic co-selection, where the use of one antibiotic will exert selection pressure on all the ARGs that are on the same mobile element.

Our results show that most of the resistomes of pathogenic and environmental bacteria of the genus *Serratia* are very similar in the number of ARGs shared, being the content of horizontally transferred genes what determine the differences with the nosocomial strains. To date there are around 350 *S. marcescens* genomes in the NCBI database, and more than 450 for the whole genus, but only 10.8% of these genomes are assembled and annotated completely. We decided to work with complete genomes retrieved from NCBI's GenBank and RefSeq repositories to avoid biases introduced by highly fragmented genomes in phylogenomic inference and comparative pan-genomic. This can lead to a potential limitation of our results; nevertheless, we presume that the results obtained here are a suitable approximation for the resistome of this bacterial genus.

The nosocomial strains with the highest number of acquired ARGs are *S. marcescens* CAV1429 and Sm39 with 14 and 8 genes on their plasmids, respectively, mostly β -lactamases. We also found that both pathogenic and environmental strains share genes with high nucleotide identities confirming what has been previously observed, in that the environmental isolates from soil (D'Costa et al., 2006), plants and water represent a natural reservoir for ARGs (Riesenfeld et al., 2004). While ARGs of environmental isolates may originally have had different functions aside from conferring resistance to antibiotics produced by other competing bacteria, these genes have now been acquired as resistance genes in pathogenic bacteria via HGT (Berglund, 2015). There are several other known factors that promote resistance in susceptible bacteria: selection pressure placed on susceptible microbes through the use of therapeutic agents, over-prescription, self-medication, treatment non-compliance, use of antibiotics in food-producing animals and in agriculture in general (Knobler, 2003), and an increase in antimicrobial residues found in the environment, most particularly in water (Harris et al., 2013). It is important to raise awareness concerning the excessive use of antibiotics in agricultural, poultry and livestock industries by creating specialized surveillance institutions that coordinate the health, food and environmental sectors, enabling the identification of the many routes for both dissemination and acquisition of ARGs from agricultural and environmental microbial communities to human pathogens, preventing nosocomial outbreaks. It is also crucial to identify the intrinsic resistance profile of a given microorganism or species in order to select the most suitable antimicrobial treatment not forgetting to link the laboratory-based phenotype antibiogram to the genomic data to understand which ARGs are in circulation and which represent a threat to the medical community (McArthur and Wright, 2015). Due to the fact that the *Serratia* species have a high number of efflux systems, no matter how many times a new antibiotic molecule is generated, resistance will persist. Therefore, new strategies for generating effective

treatments have to take into account other targets, for example, inhibiting the expression of regulatory genes of the efflux pumps.

Whole genome sequencing and metagenomics are opening the door to rapid genotype-based resistance diagnosis (Bertelli and Greub, 2013; Wyrsh et al., 2016) that in turn are helping in the rapid detection and effective treatment of bacterial infections.

CONCLUSION

Awareness of the increasing problem related to antibiotic resistance has been a great concern in public health in recent years. Combating this problem requires an understanding of the mechanisms, evolution and spread of ARGs and the manufacture of new drugs that can circumvent resistance. Members of the *Serratia* genus are gram-negative bacteria of the *Enterobacteriaceae* family that have been isolated from various ecological niches, such as soil, water and hospitals. *S. marcescens* has emerged recently as an opportunistic pathogen associated mostly with nosocomial infections. *Serratia* spp. infections pose a major health problem due to their high multidrug resistance, mainly because of the high number of efflux pump genes present in their genomes. This makes it difficult to choose suitable treatments. Knowing the genomic composition of *Serratia* spp. and the genes that confer resistance, will allow timely treatments to be determined and avoid those antibiotics to which the bacterium has a natural or acquired resistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LS-M performed the experiments, did the phylogenetic analysis, analyzed the data, and wrote the paper. PV performed the bioinformatic analysis. AC the final approval of the version of the manuscript to be published. RM-E conceived and designed the experiments, contributed in writing the paper, and gave the final approval for the publication.

FUNDING

This research was funded by DGAPA-PAPIIT Grant numbers IN213816 and IN211814 from Universidad Nacional Autónoma de México and by CONACYT Grant numbers 100343 and 179133.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by El Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) of which LS-M is a doctoral student. We are also grateful to Gabriela Delgado for her helpful discussions,

to José Luis Méndez for his support in the laboratory essays and to Luis Fernando Espinosa for his technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00828/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Venn diagram of the consensus core-genome of the 32 *Serratia* spp. genomes generated by COG, OMCL, and BDBH algorithms.

FIGURE S2 | Pairwise core-genome average nucleotide identity values from OMCL clusters (cgANiB-OMCL). The colors in the heat map represent pairwise ANI values, with a gradient from light yellow (high identity) to red (low identity).

REFERENCES

- Abebe-Akele, F., Tisa, L. S., Cooper, V. S., Hatcher, P. J., Abebe, E., and Thomas, W. K. (2015). Genome sequence and comparative analysis of a putative entomopathogenic *Serratia* isolated from *Caenorhabditis briggsae*. *BMC Genomics* 16:531. doi: 10.1186/s12864-015-1697-8
- Aenderkerk, S., Diggle, S. P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P., et al. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 151, 1113–1125. doi: 10.1099/mic.0.27631-0
- Aldema, M. L., McMurry, L. M., Walmsley, A. R., and Levy, S. B. (1996). Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* 19, 187–195. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.359886.x
- Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J., Gaarder, A., and Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 3, 243–251. doi: 10.1038/ismej.2008.86
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andersson, D. I., and Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its costs: it is possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271. doi: 10.1038/nrmicro2319
- Begic, S., and Worobec, E. (2008). Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can. J. Microbiol.* 54, 411–416. doi: 10.1139/w08-019
- Berglund, B. (2015). Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5:28564. doi: 10.3402/iee.v5.28564
- Bernard, R., El Ghachi, M., Mengin-Lecreux, D., Chippaux, M., and Denizot, F. (2005). BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J. Biol. Chem.* 280, 28852–28857. doi: 10.1074/jbc.M413750200
- Bertelli, C., and Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Simon Fraser University Research Computing Group Lau, B. Y., Hoad, G. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* 45, W30–W35. doi: 10.1093/nar/gkx343
- Bertrand, X., and Dowzicky, M. J. (2012). Antimicrobial susceptibility among Gram-negative isolates collected from Intensive Care Units in North America, Europe, the Asia-Pacific Rim, Latin America, the Middle East, and Africa between 2004 and 2009 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial. *Clin. Ther.* 34, 124–137. doi: 10.1016/j.clinthera.2011.11.023
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. doi: 10.1038/nrmicro3380
- FIGURE S3** | Venn analysis of the pan-genome of the 32 *Serratia* spp. genomes generated by COG and OMCL algorithms.
- TABLE S1** | List of the 32 *Serratia* spp. genomes used in this study, source of isolation, geographic region, continent, NCBI genome reference number, and genome size.
- TABLE S2** | Total number of ARGs and efflux pumps identified in the 32 *Serratia* genomes. Genes found on the chromosome in white color, genes found on plasmids in orange color, genes found on transposons in blue color, genes found on probable genomic islands in purple color, regulatory genes in pink color and genes with mutations that confer resistance in green color.
- TABLE S3** | Plasmids and acquired ARGs of the 32 *Serratia* spp. genomes. β -lactam resistance genes: blue, aminoglycoside resistance genes: red, macrolide resistance gene: yellow, sulfamide/trimethoprim resistance gene: pink, quaternary ammonium compounds: green.
- Bojorquez, D., Belel, M., Delira, S. F., Sholly, S., Mead, J., and Tolmasky, M. E. (1998). Characterization of OXA-9, a beta-lactamase encoded by the multiresistance transposon Tn1331. *Cell. Mol. Biol.* 44, 483–491.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951. doi: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001
- Brown, D. G., Swanson, J. K., and Allen, C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2777–2786. doi: 10.1128/AEM.00984-06
- Bruen, T. C., Philippe, H., and Bryant, D. (2006). A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172, 2665–2681. doi: 10.1534/genetics.105.048975
- Bush, K., and Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Chen, J., Kuroda, T., Huda, M. N., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 176–179. doi: 10.1093/jac/dkg308
- Chiang, P. C., Wu, T. L., Kuo, A. J., Huang, Y. C., Chung, T. Y., Lin, C. S., et al. (2013). Outbreak of *Serratia marcescens* postsurgical bloodstream infection due to contaminated intravenous pain control fluids. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e718–e722. doi: 10.1016/j.ijid.2013.02.012
- Chung, Y. J., and Saier, M. H. (2002). Overexpression of the *Escherichia coli* sugE gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *J. Bacteriol.* 184, 2543–2545. doi: 10.1128/JB.184.9.2543-2545.2002
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., and Doublet, B. (2017). Editorial: genetics of acquired antimicrobial resistance in animal and zoonotic pathogens. *Front. Microbiol.* 8:2428. doi: 10.3389/fmicb.2017.02428
- Contreras-Moreira, B., and Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7696–7701. doi: 10.1128/AEM.02411-13
- Darling, A. E., Mau, B., and Perna, N. T. (2010). Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* 5:e11147. doi: 10.1371/journal.pone.0011147
- Davies, J., and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10
- Dawczynski, K., Proquitté, H., Roedel, J., Edel, B., Pfeifer, Y., and Hoye, H., et al. (2016). Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the neonatal Intensive Care Unit, Jena, Germany, 2013–2014. *Infection* 44, 739–746. doi: 10.1007/s15010-016-0922-y
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377. doi: 10.1126/science.1120800

- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., et al. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14:45. doi: 10.1186/s12941-015-0100-6
- Dutta, C., and Paul, S. (2012). Microbial lifestyle and genome signatures. *Curr. Genomics* 13, 153–162. doi: 10.2174/138920212799860698
- Ee, R., Lim, Y.-L., Yin, W.-F., See-Too, W.-S., Roberts, R. J., and Chan, K.-G. (2016). Novel methyltransferase recognition motif identified in *Chania multitudinisentens* RB-25T gen. nov., sp. nov. *Front. Microbiol.* 7:1362. doi: 10.3389/fmicb.2016.01362
- Engelhart, S., Saborowski, F., Krakau, M., Scherholz-Schlösser, G., Heyer, I., and Exner, M. (2003). Severe *Serratia liquefaciens* sepsis following vitamin C infusion treatment by a naturopathic practitioner. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3986–3988. doi: 10.1128/JCM.41.8.3986-3988.2003
- Fernández, L., and Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681. doi: 10.1128/CMR.00043-12
- Fitzpatrick, A. W. P., Llabrés, S., Neuberger, A., Blaza, J. N., Bai, X.-C., Okada, U., et al. (2017). Structure of the MacAB–TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol.* 2:17070. doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.70
- Furukawa, H., Tsay, J. T., Jackowski, S., Takamura, Y., and Rock, C. O. (1993). Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by emrAB. *J. Bacteriol.* 175, 3723–3729. doi: 10.1128/jb.175.12.3723-3729.1993
- Gower, J. (1998). “Principal coordinates analysis,” in *Encyclopedia of Biostatistics*, eds P. Armitage and T. Coulton (Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc), 5, 3514–3518.
- Grohskopf, L. A., Roth, V. R., Feikin, D. R., Arduino, M. J., Carson, L. A., Tokars, J. I., et al. (2001). *Serratia liquefaciens* bloodstream infections from contamination of epoetin alfa at a hemodialysis center. *N. Engl. J. Med.* 3, 1491–1497. doi: 10.1056/NEJM200105173442001
- Gupta, N., Hocevar, S. N., Moulton-Meisner, H. A., Stevens, K. M., McIntyre, M. G., Jensen, B., et al. (2014). Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.* 59, 1–8. doi: 10.1093/cid/ciu218
- Gupta, N., Limbago, B. M., Patel, J. B., and Kallen, A. J. (2011). Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin. Infect. Dis.* 53, 60–67. doi: 10.1093/cid/cir202
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Harris, S., Cormican, M., and Cummins, E. (2013). Risk ranking of antimicrobials in the aquatic environment from human consumption: an Irish case study. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 19, 1264–1284. doi: 10.1080/10807039.2012.713826
- Heng, J., Zhao, Y., Liu, M., Liu, Y., Fan, J., Wang, X., et al. (2015). Substrate-bound structure of the *E. coli* multidrug resistance transporter MdfA. *Cell Res.* 25, 1060–1073. doi: 10.1038/cr.2015.94
- Hervé, B., Chomali, M., Gutiérrez, C., Luna, M., Rivas, J., Blamey, R., et al. (2015). Outbreak due to *Serratia marcescens* associated with intrinsic contamination of aqueous chlorhexidine. *Rev. Chilena Infectol.* 32, 517–522. doi: 10.4067/S0716-10182015000600004
- Hopkins, K. L., Davies, R. H., and Threlfall, E. J. (2005). Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 358–373. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.02.006
- Hu, Y., Zhu, Y., Ma, Y., Liu, F., Lu, N., Yang, X., et al. (2015). Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1152–1161. doi: 10.1128/AAC.04260-14
- Iguchi, A., Nagaya, Y., Pradel, E., Ooka, T., Ogura, Y., Katsura, K., et al. (2014). Genome evolution and plasticity of *Serratia marcescens*, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Genome Biol. Evol.* 6, 2096–2110. doi: 10.1093/gbe/evu160
- Iredell, J., Brown, J., and Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mechanisms and clinical implications. *BMJ* 352:h6420. doi: 10.1136/bmj.h6420
- Jacobsen, A., Hendriksen, R. S., Aaresturp, F. M., Ussery, D. W., and Friis, C. (2011). The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb. Ecol.* 62, 487–504. doi: 10.1007/s00248-011-9880-1
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182. doi: 10.1128/CMR.00036-08
- Johnson, T. J., Siek, K. E., Johnson, S. J., and Nolan, L. K. (2006). DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* 188, 745–758. doi: 10.1128/JB.188.2.745
- Knobler, S. L. (2003). “Forum on emerging infections. Factors contributing to the emergence of resistance,” in *The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment: Workshop Summary*, eds S. L. Knobler, S. M. Lemon, M. Najafi, et al. (Washington DC, National Academies Press, US), 5. doi: 10.17226/10651
- Kumar, A., and Worobec, E. A. (2005). Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. *Society* 49, 1495–1501. doi: 10.1128/AAC.49.4.1495
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., and Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9, 299–306. doi: 10.1093/bib/bbn017
- Kwak, Y., Khan, A. R., and Shin, J. H. (2015). Genome sequence of *Serratia nematodiphila* DSM 21420T, a symbiotic bacterium from entomopathogenic nematode. *J. Biotechnol.* 193, 1–2. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.11.002
- Lamelas, A., Gosalbes, M. J., Manzano-Marin, A., Peretó, J., Moya, A., and Latorre, A. (2011). *Serratia symbiotica* from the Aphid *Cinara cedri*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet.* 7:e1002357. doi: 10.1371/journal.pgen.1002357
- Li, P., Kwok, A. H. Y., Jiang, J., Ran, T., Xu, D., Wang, W., et al. (2015). Comparative genome analyses of *Serratia marcescens* FS14 reveals its high antagonistic potential. *PLoS One* 10:e0123061. doi: 10.1371/journal.pone.0123061
- Lin, Q. Y., Tsai, Y. L., Liu, M. C., Lin, W. C., Hsueh, P. R., and Liaw, S. J. (2014). *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5181–5190. doi: 10.1128/AAC.00013-14
- Liou, B. H., Duh, R. W., Lin, Y. T., Lauderdale, T. L. Y., Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance (TSAR) Hospitals (2014). A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 47, 387–393. doi: 10.1016/j.jmii.2013.04.003
- Liu, D., Zhang, L. P., Huang, S. F., Wang, Z., Chen, P., Wang, H., et al. (2011). Outbreak of *Serratia marcescens* infection due to contamination of multiple-dose vial of heparin-saline solution used to flush deep venous catheters or peripheral trocars. *J. Hosp. Infect.* 77, 175–176. doi: 10.1016/j.jhin.2010.10.003
- Liu, W., Fang, L., Li, M., Li, S., Guo, S., Luo, R., et al. (2012). Comparative genomics of *Mycoplasma*: analysis of conserved essential genes and diversity of the pan-genome. *PLoS One* 7:e35698. doi: 10.1371/journal.pone.0035698
- Lu, S., and Zgurskaya, H. I. (2012). Role of ATP binding and hydrolysis in assembly of MacAB–TolC macrolide transporter. *Mol. Microbiol.* 86, 1132–1143. doi: 10.1111/mmi.12046
- MacDougall, C. (2011). Beyond susceptible and resistant, Part I: treatment of infections due to Gram-negative organisms with inducible β -lactamases. *J. Pediatr. Pharmacol. Ther.* 16, 23–30. doi: 10.1056/NEJMra1313875
- Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 755–791. doi: 10.1128/CMR.00017-11
- Matsuo, T., Chen, J., Minato, Y., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., et al. (2008). SmdAB, a heterodimeric ABC-type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 190, 648–654. doi: 10.1128/JB.01513-07
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3348–3357. doi: 10.1128/AAC.00419-13
- McArthur, A. G., and Wright, G. D. (2015). Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology. *Curr. Opin. Microbiol.* 27, 45–50. doi: 10.1016/j.mib.2015.07.004
- Merkier, A. K., Rodríguez, M. C., Togneri, A., Brengi, S., Osuna, C., Pichel, M., et al. (2013). Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2295–2302. doi: 10.1128/JCM.03280-12
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ–OpmE and MexMN–OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49, 999–1002. doi: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x
- Minato, Y., Shahcheraghi, F., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2008). Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux

- pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 516–519. doi: 10.1248/bpb.31.516
- Morillo, Á., González, V., Aguayo, J., Carreño, C., Torres, M. J., Jarana, D., et al. (2016). A six-month *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal Intensive Care Unit. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 645–651. doi: 10.1016/j.eimc.2016.01.006
- Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–37. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., and Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective Stochastic algorithm for estimating Maximum-Likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. doi: 10.1093/molbev/msu300
- Olaitan, A. O., Morand, S., and Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* 5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum Beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 42, 3.1.1–3.1.8. doi: 10.1002/0471250953.bi0301s42
- Piddock, L. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636. doi: 10.1038/nrmicro1464
- Potrykus, J., and Wegryn, G. (2001). Chloramphenicol-sensitive *Escherichia coli* strain expressing the chloramphenicol acetyltransferase (cat) gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3610–3612. doi: 10.1128/AAC.45.12.3610
- Rather, P. N., Munayyer, H., Mann, P. A., Hare, R. S., Miller, G. H., Shawt, K. J. (1992). Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase I_b and I_a proteins. *J. Bacteriol.* 174, 3196–3203. doi: 10.1128/jb.174.10.3196-3203.1992
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M., and Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6, 981–989. doi: 10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x
- Rosenberg, E. Y., Ma, D., and Nikaido, H. (2000). AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* 182, 1754–1756. doi: 10.1128/JB.182.6.2000
- Rouli, L., Merhej, V., Fournier, P.-E., and Raoult, D. (2015). The bacterial pangenome as a new tool for analyzing pathogenic bacteria. *New Microbes New Infect.* 7, 72–85. doi: 10.1016/j.nmni.2015.06.00
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Soberón-Chávez, G., and Morales-Espinosa, R. (2016). Complete genome sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a nonpigmented multidrug-resistant strain isolated from a Mexican patient with obstructive pulmonary disease. *Genome Announc.* 4:e01417-15. doi: 10.1128/genomeA.01417-15
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 519–542. doi: 10.1016/j.femsre.2004.04.001
- Shahcheraghi, F., Minato, Y., Chen, J., Mizushima, T., Ogawa, W., Kuroda, T., et al. (2007). Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 798–800. doi: 10.1248/bpb.30.798
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., and Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamase: types, epidemiology and treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 22, 90–101. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002
- Shanks, R. M. Q., Davra, V. R., Romanowski, E. G., Brothers, K. M., Stella, N. A., Godbole, D., et al. (2013). An eye to a kill: using predatory bacteria to control Gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One* 8:e66723. doi: 10.1371/journal.pone.0066723
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., and Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138–163. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.003
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Sabatelli, F. J., Mann, P., Munayyer, H., Mierzwa, R., et al. (1992). Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1447–1455. doi: 10.1128/aac.36.7.1447
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75
- Siguié, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., and Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, 32–36. doi: 10.1093/nar/gkj014
- Šiširak, M., and Hukić, M. (2013). An outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*: the importance of continuous monitoring of nosocomial infections. *Acta Med. Acad.* 42, 25–31. doi: 10.5644/ama2006-124.67
- Sunenshine, R. H., Tan, E. T., Terashita, D. M., Jensen, B. J., Kacica, M. A., Sickbert-Bennett, E. E., et al. (2007). A multistate outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infection associated with contaminated intravenous magnesium sulfate from a compounding pharmacy. *Clin. Infect. Dis.* 45, 527–533. doi: 10.1086/520664
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., and Sakakibara, S. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 333–337. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011
- Tettelin, H., Riley, D., Cattuto, C., and Medini, D. (2008). Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 472–477. doi: 10.1016/j.mib.2008.09.006
- Thompson, C. C., Vicente, A. C., Souza, R. C., Vasconcelos, A. T., Vesth, T., Alves, N. Jr., et al. (2009). Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evol. Biol.* 9:258. doi: 10.1186/1471-2148-9-258
- Van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., and Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2:203. doi: 10.3389/fmicb.2011.00203
- Vedantam, G., Guay, G. G., Austria, N. E., Doktor, S. Z., and Nichols, B. P. (1998). Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 88–93.
- Velasco, C., Rodríguez-Martínez, J. M., Briales, A., Díaz de Alba, P., Calvo, J., and Pascual, A. (2009). Smaqr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 239–242. doi: 10.1093/jac/dkp424
- Vetter, L., Schuepfer, G., Kuster, S. P., and Rossi, M. (2016). A hospital-wide outbreak of *Serratia marcescens*, and Ishikawa's “Fishbone” analysis to support outbreak control. *Qual. Manag. Health Care* 25, 1–7. doi: 10.1097/QMH.000000000000078
- Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E., and Contreras-Moreira, B. (2018). GET_PHYLOMARKERS, a software package to select optimal orthologous clusters for phylogenomics and inferring pan-genome phylogenies, used for a critical gene-taxonomic revision of the genus *Stenotrophomonas*. *Front. Microbiol.* 9:771. doi: 10.3389/fmicb.2018.00771
- Vinuesa, P., and Contreras-Moreira, B. (2015). “Robust identification of orthologues and paralogues for microbial pan-genomics using GET_HOMOLOGUES: a case study of plncA/C Plasmids,” in *Bacterial Pangenomics. Methods in Molecular Biology*, eds A. Mengoni, M. Galardini, and M. M. Fondi (New York, NY: Humana Press).
- Wang, D., Hou, W., Chen, J., Mou, Y., Yang, L. J., Yang, L. Q., et al. (2014). Characterization of the blaKPC-2 and blaKPC-3 genes and the novel blaKPC-15 gene in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 63, 981–987. doi: 10.1099/jmm.0.073841-0
- Webber, M., and Piddock, L. J. (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 32, 275–284. doi: 10.1051/vetres:2001124
- Weigel, L. M., Steward, C. D., and Tenover, F. C. (1998). *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2661–2667.
- Weyenberg, G., Huggins, P. M., Schardl, C. L., Howe, D. K., and Yoshida, R. (2014). kdetrees: non-parametric estimation of phylogenetic tree distributions. *Bioinformatics* 30, 2280–2287. doi: 10.1093/bioinformatics/btu258
- Wu, Y. M., Hsu, P. C., Yang, C. C., Chang, H. J., Ye, J. J., Huang, C. T., et al. (2013). *Serratia marcescens* meningitis: epidemiology, prognostic factors and treatment outcomes. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 46, 259–265. doi: 10.1016/j.jmii.2012.07.006
- Wyrsh, E. R., Chowdhury, P. R., Chapman, T. A., Charles, I. G., Hammond, J. M., and Djordjevic, S. P. (2016). Genomic microbial epidemiology is needed to comprehend the global problem of antibiotic resistance and to improve pathogen diagnosis. *Front. Microbiol.* 7:843. doi: 10.3389/fmicb.2016.00843

- Yao, X., Sun, Q., Liu, W., Yin, X., Pei, G., Wang, Y., et al. (2016). Complete genome sequence of *Serratia rubidaea* isolated in China. *Genome Announc.* 4:e00283-16. doi: 10.1128/genomeA.00283-16
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., and Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1271–1272. doi: 10.1128/AAC.34.6.1271
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2640–2644. doi: 10.1093/jac/dks261

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Sandner-Miranda, Vinuesa, Cravioto and Morales-Espinosa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.