



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

BASES MOLECULARES DE LA VIRULENCIA DE *SALMONELLA ENTERICA* SV
TYPHIMURIUM GENOTIPO ST213

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. ISELA SERRANO FUJARTE

TUTOR PRINCIPAL

Dr. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. MARTIN GUSTAVO PEDRAZA ALVA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. PABLO VINUESA FLEISCHMANN
[Centro de Ciencias Genómicas, UNAM](#)

Cuernavaca, Mor. Septiembre, 2023



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.

A Mi madre
A mis Ma. Luisas
A mi abuelo



Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección del Dr. José Luis Puente García.

Durante la elaboración de este trabajo la M. en C. Isela Serrano Fujarte recibió una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con No. 354699, así como una beca DGAPA/UNAM del proyecto No. IN-218322 de José Luis Puente y el apoyo del PAEP para movilidad académica.

El presente proyecto se realizó gracias al financiamiento de los proyectos IN215119 e IN218322 otorgados a José Luis Puente García.

Se extienden agradecimientos a los técnicos académicos, Dra. Lucia Perezgasga Ciscomani, Dra. Alejandra Vázquez Ramos, Biol. Francisco Javier Santana Estrada y M.C. Marcos Fernández Mora. Y en especial a los doctores Edmundo Calva Mercado y José Luis Puente García por el apoyo académico y formativo durante el desarrollo del proyecto.

Se agradece también a los miembros del comité tutorial y el jurado de grado por la retroalimentación al presente trabajo:

Comité Tutorial:

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

Jurado de grado:

Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella

Dr. Víctor Manuel González Zúñiga

Dr. Ayixon Sánchez Reyes

Dra. Corina-Diana Ceapa

Dra. Tania Rivera Hernández

Índice

1. Resumen.....	1
1.1. Abstract	2
2. Introducción.....	3
2.1. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. Typhimurium	3
2.2. Estructura poblacional de <i>S. Typhimurium</i> : una aproximación a la diversidad dentro del serovar.....	5
2.3. Diversidad fenotípica de <i>S. Typhimurium</i> y sus implicaciones en su supervivencia ambiental y patogénesis.....	7
2.4. Enfoques integrales para el estudio de <i>S. Typhimurium</i>	8
3. Antecedentes.....	10
4. Justificación	12
5. Objetivos.....	12
5.1. Objetivo General	12
5.2. Objetivos específicos	12
6. Materiales y métodos	13
6.1. Análisis filogenéticos	13
6.2. Análisis del genoma accesorio	14
6.3. Cepas y condiciones de cultivo.....	15
6.4. Construcción de cepas mutantes.....	15
6.5. Formación y análisis de macrocolonias RDAR	17
6.6. Formación de biopelículas	18
6.7. Cultivo de células eucariotas	18
6.8. Ensayos de infección en células eucariotas y cuantificación de LDH.....	20
6.9. Ensayos de motilidad	22
6.10. Perfiles de proteínas secretadas y de membrana externa.....	22
7. Resultados	24
7.1. Exploración de la estructura poblacional, distribución geográfica e historia evolutiva del genotipo ST213 de <i>S. Typhimurium</i>	24
7.1.1. La estructura poblacional del genotipo ST213 muestra evidencia de evolución intra-genotipo.....	24
7.1.2. La adquisición de genoma accesorio a través de múltiples eventos de transferencia horizontal ha diversificado geográficamente al genotipo ST213..	27
7.1.3 La reconstrucción histórica del genotipo ST213 revela un detonante potencial para la expansión de las cepas NA-ST213.....	33

7.2	Caracterización fenotípica de cepas de <i>S. Typhimurium</i> ST213.....	35
7.2.1	Análisis genómico de las cepas NA-ST213 seleccionadas para las caracterizaciones fenotípicas.....	35
7.2.2	Las cepas del genotipo NA-ST213 forman biopelículas diversas.....	37
7.2.3	Los aislados NA-ST213 presentan baja internalización y elevada replicación en células eucariotas.....	42
7.2.4	Dos cepas NA-ST213 no expresan completa la proteína de membrana externa OmpD.....	49
7.3	Avances de casos de estudio específicos de las cepas NA-ST213.....	51
7.3.1	Estudio de una población mixta de <i>S. Typhimurium</i> formada por una cepa ST19 y una ST213.....	51
7.3.2	Motilidad y competencia por espacio	55
8	Conclusiones y discusión.....	57
9	Perspectivas	62
10	Referencias	64

1. Resumen

Salmonella enterica serovar Typhimurium (S. Typhimurium), es un patógeno de amplio rango de hospederos capaz de causar infecciones gastrointestinales (localizadas) e invasivas (sistémicas) en humanos. Debido a su importancia clínica, tres cepas pertenecientes al genotipo ST19 (LT2, 14028 y SL1344), se han usado como referencia para estudiar las interacciones patógeno-hospedero y la supervivencia ambiental de este microorganismo. Sin embargo, estas cepas no representan toda la diversidad comprendida dentro del serovar Typhimurium. Por lo tanto, para expandir el campo de conocimiento, en este trabajo se estudió el genotipo emergente ST213 el cual se ha asociado a infecciones invasivas y gastrointestinales.

Se estudiaron las bases genéticas que generan diversidad intra-genotipo explorando bioinformática y fenotípicamente una colección de aislados ST213 secuenciados cuyos genomas se encuentran depositados en la EnteroBase, lo que permitió identificar dos subpoblaciones divididas por región geográfica: Europa (EU-ST213) y Norteamérica (NA-ST213).

Los aislados NA-ST213 presentaron amplios perfiles de multi-resistencia a antibióticos y un contenido distintivo de plásmidos, profagos y espaciadores en los *loci* CRISPR, mientras que las cepas EU-ST213 presentaron características similares a las cepas de referencia ST19. Este estudio ilustra procesos evolutivos del genotipo ST213, tales como su estructura poblacional, historia evolutiva y contenido del genoma accesorio. Lo anterior se complementó con análisis fenotípicos de cepas NA-ST213 representativas, con la intención de proveer un marco contextual para el estudio y vigilancia de este genotipo emergente desde una perspectiva integral, además, este trabajo puede alertar del riesgo que estas cepas representan, debido a su relación filogenética con cepas del genotipo ST34 que se han convertido en pandémicas en los últimos años.

1.1. Abstract

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a gram-negative pathogen associated with the food chain and gastrointestinal and invasive infections around the world. Due to the clinical importance of the serovar Typhimurium, three strains belonging to the ST19 genotype (LT2, 14028 and SL1344) have been used as reference strains to study host-pathogen interactions and the environmental survival of this microorganism. However, these strains do not represent all the diversity within the serovar Typhimurium. Therefore, to expand the knowledge, we studied the emerging ST213 genotype, which has been associated with invasive and gastrointestinal infections.

Here, we applied genomic and phenotypic analyses to illustrate the diversity and evolution of the ST213 genotype. We inferred the ST213 population structure and evolutive history, which revealed the intra-genotype diversity that separates the North American ST213 isolates (NA-ST213) from other *S. Typhimurium* genotypes, including European ST213 isolates. NA-ST213 isolates were distributed in four co-circulating lineages with multidrug resistance profiles and unique phage and CRISPR spacers patterns that could have shaped their local microevolution.

Phenotypically, NA-ST213 isolates showed strong biofilm formation, distinctive but diverse RDAR morphotype signatures, and amyloid fiber production. They also showed diminished ability to adhere to and internalize in cultured eukaryotic cell lines; in contrast, they replicated and survived intracellularly with higher efficiency. Hence, this work highlights the relevance of studying an emergent *S. Typhimurium* genotype and the events leading to its diversification beyond the well-characterized reference strains and worldwide predominant genotypes. However, it must also serve as a cautionary tale of the potential health risk the NA-ST213 may represent; particularly, when there is a close phylogenetic relationship with genotypes, such as the monophasic ST34 genotype, that became pandemic over time.

2. Introducción

2.1. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. *Typhimurium*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está conformado por bacterias Gram-negativas motiles, anaerobias facultativas capaces de reducir nitratos o nitritos y fermentar glucosa. Dentro de este género se han reconocido dos especies, *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última es una especie ubicua, altamente heterogénea y capaz de infectar un amplio rango de hospederos, que a su vez está subdividida en más de 2600 serovares los cuales pueden diferir en su adaptación a varios hospederos, así como en la enfermedad que causan. Por ejemplo, los serovares *S. enterica* sv. Typhi y sv Paratyphi A, pueden infectar únicamente a humanos causando una infección invasiva potencialmente mortal, llamada fiebre tifoidea¹.

En contraste, los serovares no tifoideos tienen un amplio rango de hospederos y pueden infectar diferentes especies animales incluyendo reptiles, aves y mamíferos. Tal es el caso de *S. enterica* sv. Typhimurium (*S. Typhimurium*), un serovar que en ratones puede causar una enfermedad similar a la fiebre tifoidea en humanos, mientras que en humanos sanos la infección por *S. Typhimurium* se asocia a una inflamación localizada autolimitada del íleon terminal y el colón, denominada gastroenteritis; sin embargo, en niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas puede causar infecciones sistémicas (invasivas)¹⁻³.

Para que *S. Typhimurium* pueda causar infección después de ser ingerida debe sobrevivir al pH ácido del estómago, para posteriormente alcanzar el intestino delgado en donde debe atravesar la mucosa intestinal para adherirse a las células epiteliales e inducir los mecanismos que permiten su internalización a células no fagocíticas como los enterocitos. Para lograrlo, emplea diferentes factores de virulencia codificados en plásmidos o en el cromosoma, agrupados en las denominadas islas de patogenicidad de *Salmonella* (SPIs por sus siglas en inglés). La isla de patogenicidad 1 (SPI-1) es esencial en el proceso de invasión, ya que codifica para un sistema de secreción tipo 3 (SST3) que actúa como una jeringa molecular que inyecta proteínas efectoras desde la bacteria hacia el citosol de la célula hospedera, las cuales, entre otros efectos, generan profundos rearrreglos en el citoesqueleto que permiten al patógeno internalizarse por macropinocitosis^{4,5}.

Dentro de la célula hospedera, *Salmonella* reside en una vacuola en donde puede sobrevivir y replicarse gracias a la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) que, al igual que SPI-1, codifica para un SST3 con el que transloca efectores desde la vacuola al citosol que le permiten subvertir, entre otras funciones, la fusión lisosomal⁴. Las vacuolas pueden migrar a través del epitelio intestinal hacia la membrana basolateral donde el patógeno puede ser fagocitado por células del sistema inmune, lo cual facilita su diseminación a través del torrente sanguíneo hacia otros tejidos y órganos⁴ (**Fig. 1**).

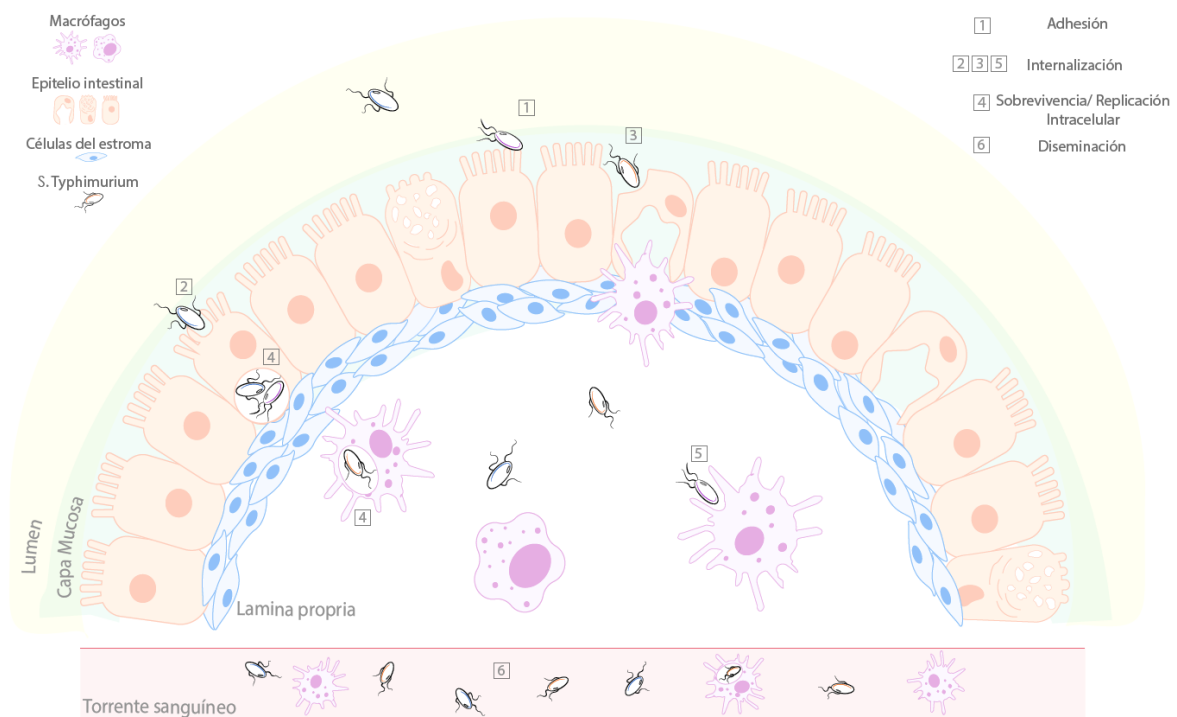


Figura 1| Patogénesis de *S. Typhimurium*. Después de la ingesta *S. Typhimurium* llega al lumen intestinal donde puede comenzar su proceso de patogénesis. En una primera etapa la bacteria se adhiere brevemente a las células del epitelio intestinal (**1**) donde promueve su internalización al citosol de células no fagocíticas (**2**) o atraviesa directamente el epitelio intestinal al ser captada por células M (**3**), dentro de las células, el patógeno reside en una vacuola en la que puede sobrevivir y replicarse (**4**). En esta vacuola puede llegar a la membrana basolateral de enterocito donde la bacteria es liberada y, a su vez, puede ser fagocitada por células del sistema inmune (**5**), dentro de las cuales puede sobrevivir (**4**). En el caso de las cepas invasivas los macrófagos infectados permiten su diseminación sistémica a través del torrente sanguíneo (**6**).

Además de ser capaz de establecer infecciones en un hospedero susceptible, *S. Typhimurium* también puede sobrevivir en el ambiente formando biopelículas, un comportamiento multicelular que le permite a la bacteria protegerse de la desecación y los antimicrobianos, así como sobrevivir en condiciones en donde los

nutrientes son limitados⁶. La formación de biopelículas puede ser uno de los mecanismos por los cuales *Salmonella* sobrevive en sus reservorios abióticos incrementando su habilidad para transmitirse y por lo tanto, causar infecciones^{6,7}. *S. Typhi* es un ejemplo interesante, ya que persiste formando biopelículas en los cálculos en la vesícula biliar⁸.

Aunque existen estudios sobre la sobrevivencia ambiental y patogénesis de *S. Typhimurium* en cepas de referencia y otros serovares, la diversidad de los fenotipos asociados a estas cualidades y de los elementos involucrados no se han estudiado en detalle comparando diferentes aislados de un mismo genotipo o de diferentes genotipos; por lo que, no se cuenta con suficiente información para inferir cómo estos cambios pueden influir en el desarrollo y transmisión de la enfermedad⁹.

2.2. Estructura poblacional de *S. Typhimurium*: una aproximación a la diversidad dentro del serovar.

Uno de los métodos que se usan más frecuentemente para clasificar aislados bacterianos es el *multilocus sequence typing* (MLST), el cual consiste en la secuenciación de fragmentos internos de siete genes altamente conservados que presentan variaciones alélicas entre diferentes aislados, los cuales se usan para definir genotipos, también denominados *sequence types* (STs)¹⁰. Este método inicialmente se consideró útil para reconstruir de forma general las relaciones evolutivas no solo entre especies, sino también a nivel de subespecies y serovares^{11,12}. Esto, ayuda a dar seguimiento epidemiológico a brotes causados por poblaciones determinadas de patógenos bacterianos, y con ello a implementar intervenciones adecuadas en el control de su expansión y diseminación de resistencias a antimicrobianos, así como a la búsqueda de tratamientos efectivos¹³.

El análisis de la estructura poblacional de *S. Typhimurium* basado en datos de MLST ha mostrado que este serovar se ha diversificado significativamente (**Fig. 2**). Gracias a los avances de la secuenciación masiva, ahora se puede tener una imagen más clara de la estructura poblacional de este serovar, a la vez permite determinar cuáles son los genotipos prevalentes alrededor del mundo, y cuales son causales de brotes epidémicos locales o pandémicos. Lo anterior es en particular relevante para aquellos genotipos diferentes al ST19, el cual es el más abundante

en el mundo y considerado el genotipo fundador, razón por la cual el estudio de la patogénesis y sobrevivencia ambiental de *S. Typhimurium* se ha centrado en pocas cepas pertenecientes a este genotipo (LT2, 14028 y SL1344); sin embargo, la identificación de cepas de otros genotipos asociadas a brotes epidémicos es una evidencia de la continua diversificación de *S. Typhimurium* lo que ha llevado a explorar otras poblaciones a nivel genómico y fenotípico.

Es importante considerar que el MLST no tiene la resolución para identificar variantes dentro de un ST dado, así como aquellas variantes a las que pueden dar lugar debido las presiones selectivas del entorno¹³. Más aún, un ST previamente asignado a un grupo de cepas que poseen características que claramente las distinguen de otros STs, puede también presentarse asociado a un grupo de cepas que muestran más cercanía filogenética con otro ST cuando el análisis se basa en estudios de genómica comparativa más profundos.

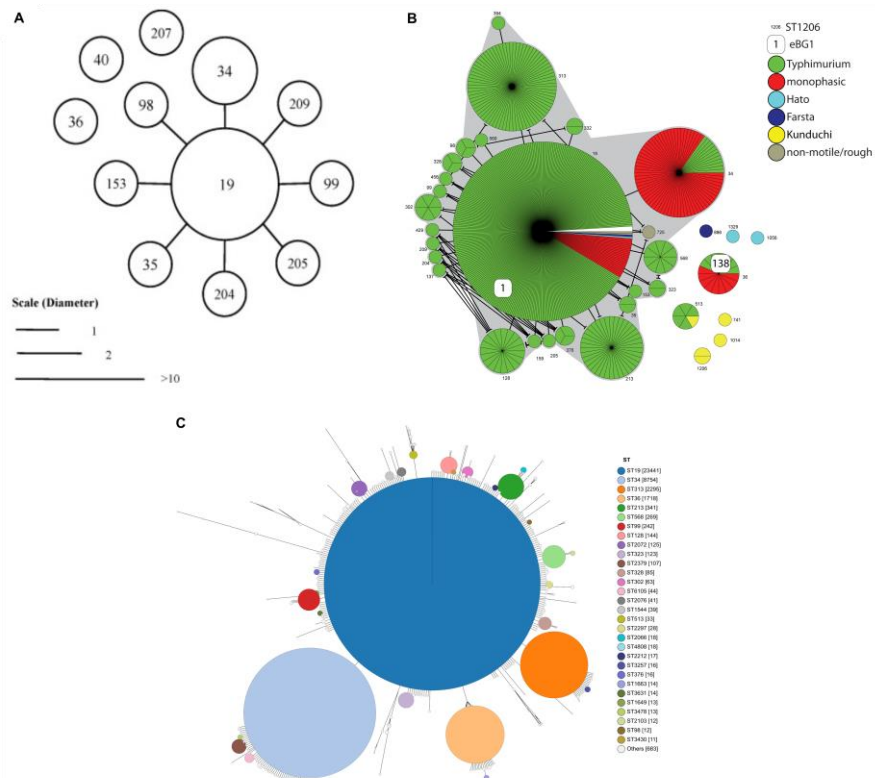


Figura 2| Árboles de relaciones entre los diferentes STs de *S. Typhimurium*. A. Diagrama de eBURST de 12 STs mostrando un complejo clonal de 9 STs construido en 2009¹¹. **B.** MSTree (minimal spanning tree) en donde cada círculo representa un ST, construido en 2012¹². **C.** GrapeTree de STs construido en este estudio en 2023 usando los genomas de *S. Typhimurium* disponibles en la EnteroBase.

2.3. Diversidad fenotípica de *S. Typhimurium* y sus implicaciones en su supervivencia ambiental y patogénesis.

La representación de algunos genotipos se ha incrementado en la base de datos del MLST (actualmente EnteroBase) en los últimos años¹⁴. En 2009 después del genotipo fundador ST19, el segundo genotipo con más de un aislado reportado era el ST34 (**Fig. 2A**); para 2012, además del ST34 y el ST19, los genotipos ST313, ST213, ST36 y ST128 aparecieron como los genotipos más frecuentemente aislados en conjunto (**Fig. 2B**), mientras que para 2023, también se encuentran el ST568 y ST99 (**Fig. 2C**). Estos genotipos han llamado la atención debido a que presentan multi-resistencias a antimicrobianos y riesgos para la salud pública, por lo tanto, algunos de ellos han comenzado a estudiarse a detalle, tal como el ST34 y el ST313, mientras que los genotipos ST36 y ST213 han sido menos estudiados.

El genotipo ST34 se ha aislado de infecciones gastrointestinales, inicialmente en Europa en a principios del siglo XXI y posee características genómicas y fenotípicas que lo distinguen del genotipo ST19. El genotipo ST34 es mayoritariamente monofásico, esto quiere decir que no expresa uno de los antígenos flagelares, principalmente el de la segunda fase (FliB) que está ausente debido a eventos de inserciones o deleciones parciales o completas del *locus fljAB*. Además, carece del plásmido de virulencia asociado a las cepas ST19 de *S. Typhimurium* (pSTV) y posee múltiples resistencias a antimicrobianos. En la actualidad se encuentra distribuido alrededor de toda Europa convirtiéndose en una cepa pandémica^{15,16}. Estudios sobre su capacidad de formar biopelículas como estrategia de sobrevivencia ambiental, han mostrado que una alta proporción de cepas ST34 muestran una capacidad moderada a fuerte de producir biopelículas en comparación con cepas ST19, lo cual podría favorecer su resiliencia y transmisión^{17,18}.

El segundo genotipo más aislado después del ST34 es el ST313, el cual se encuentra principalmente distribuido en África vinculado a infecciones invasivas severas; sin embargo, variantes de este genotipo se han encontrado en Reino Unido (UK) y Brasil, vinculadas principalmente a infecciones gastrointestinales¹⁹. El linaje ST313 en África se ha denominado el linaje invasivo (linaje 2) y posee características distintivas en comparación con otros genotipos, tal como, la

presencia del profago BTP1, el cual codifica para una proteína (BstA) que le confiere a la bacteria inmunidad contra ataque de fagos exógenos²⁰. Además, en comparación con cepas de referencia ST19, el genoma de cepas del genotipo ST313 presenta degradación génica (pseudogenización) que se propone es consecuencia de su adaptación a un estilo de vida invasivo, lo cual se ve reflejado a nivel fenotípico y transcripcional^{19,21}. Se ha observado que las cepas ST313 invaden menos eficientemente células no fagocíticas, en comparación con el genotipo ST19²². A su vez, las cepas de África del linaje 2 no pueden formar biopelículas debido a una mutación que inactiva el gen *bcsG* que se encuentra en la vía biosintética de la celulosa, y es necesaria para formar biopelículas²³. Con base en las observaciones anteriores, se ha hipotetizado que este genotipo está evolucionando a un estilo de vida antropogénico, a nivel de infección y transmisión^{22,23}.

El genotipo ST213 es el quinto más representado en la EnteroBase. Se ha asociado tanto a infecciones invasivas como gastrointestinales y se encuentra ampliamente distribuido en la cadena alimenticia en países como México²⁴. Los aislados de esta región geográfica carecen del pSTV, pero poseen características distintivas como la presencia principalmente, de plásmidos de la familia IncC y de perfiles de multi resistencia a antimicrobianos^{25,26}, sin embargo, poco trabajo se ha hecho^{27,28} para explorar a detalle su estructura poblacional en conjunto con rasgos fenotípicos asociados a su patogénesis y supervivencia.

2.4. Enfoques integrales para el estudio de *S. Typhimurium*

El estudio de los patógenos emergentes debe ser visto desde una perspectiva integral. Es bien sabido que los serovares de *Salmonella* no tifoideos (NTS) de amplio rango de hospederos poseen la ventaja de transmitirse desde reservorios ambientales hacia los animales y de éstos a los humanos y viceversa⁹; por lo tanto, es necesario entender de forma multifactorial las dinámicas ecológicas y de transmisión que mantienen la incidencia de las enfermedades infecciosas, así como el surgimiento de variantes de una misma especie como agentes causales de nuevos brotes epidémicos con características inéditas, para poder contribuir a su posterior control y erradicación. Para ello se han propuesto diferentes estrategias

que reduzcan los riesgos de enfermedades infecciosas, tal es el caso de One-Health; una estrategia que reconoce el vínculo entre los humanos, los animales, el ecosistema y la economía en el contexto de la salud humana. El uso de esta estrategia ayuda a la prevención y control de enfermedades infecciosas a través de una gestión de riesgos bien informada y que contemple la identificación, el análisis, la prevención y la mitigación de riesgos para la salud pública en el contexto de las subpoblaciones afectadas²⁹. Para ello, es importante definir si la adquisición de características distintivas se debe a mutaciones puntuales, recombinación o transferencia horizontal de genes, así como correlacionar esta información con estudios fenotípicos usando modelos adecuados *in vivo* e *in vitro*, para integrar información que apoye en la toma de decisiones y el monitoreo de patógenos emergentes como el genotipo ST213 de *S. Typhimurium* ³⁰.

3. Antecedentes

En el periodo comprendido entre el 2002 y 2005 se llevó a cabo un programa de vigilancia epidemiológica acoplado a la cadena alimenticia en cuatro regiones de México (Sonora, San Luis Potosí, Michoacán y Yucatán). Este programa incluyó la identificación de cepas del género *Salmonella*. Se colectaron 314 aislados de Typhimurium provenientes de pacientes enfermos, niños asintomáticos, animales y alimentos de origen animal. Los aislados presentaron amplia resistencia a antimicrobianos, específicamente a cefalosporinas de tercera generación. Los aislados de pacientes enfermos, fueron seis veces más resistentes a los antibióticos que aquellos aislados de niños asintomáticos. A su vez, la incidencia de esta resistencia se incrementó de 1.6% a 4.9% entre el 2000 y el 2005, y se encontró también en otros serovares, tendencia que representa un riesgo de salud pública²⁴.

Para determinar subgrupos genéticos de interés entre estos aislados multi droga resistentes (MDR) se usó *Multi Locus Sequence Typing* (MLST), lo que permitió la identificación de cuatro genotipos o *sequence types* (STs): ST19, ST213, ST302 y ST429. De éstos, los más abundantes en la muestra analizada, fueron el genotipo ST19, ampliamente distribuido en el mundo, y el genotipo ST213 que fue predominante en las cuatro regiones geográficas del país muestreadas, con una tendencia aparente a reemplazar al genotipo ancestral ST19, considerado el genotipo fundador del serovar Typhimurium^{12,25}.

Las cepas pertenecientes al genotipo ST213 presentan marcadas diferencias con respecto a las cepas prototipo ampliamente estudiadas y que pertenecen al genotipo ST19, incluyendo las cepas SL1344, ST4/74, 14028 y LT2. Poseen más de cinco resistencias a antibióticos, entre las cuales se incluye, como ya se mencionó, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación conferida por el gen *blaCMY-2* y, en general presentan plásmidos de alto peso molecular pertenecientes al grupo de incompatibilidad C; además carecen del plásmido pSTV ampliamente distribuido en el serovar Typhimurium y asociado a la virulencia en ratón²⁸. Notablemente, algunos de los aislados ST213 se obtuvieron de pacientes con infecciones invasivas, ejemplo de ellos son las cepas YUHS-05-78 y 33676, la primera aislada al final de la vigilancia epidemiológica realizada en 2005 de un

menor que presentaba hepatomegalia y trombocitopenia y la segunda de una paciente con una infección sistémica severa en 2011. Estos hallazgos ubicaron a este genotipo como un potencial agente causal de enfermedades invasivas en México, cuya presencia a lo largo de la cadena alimenticia favorece su posible diseminación y peligro para la salud pública^{28,31}.

4. Justificación

S. Typhimurium genotipo ST213, es un patógeno emergente que posee características que lo colocan como un riesgo para la salud pública de las personas. Su distribución geográfica global y estructura poblacional son aún desconocidas, así como sus rasgos fenotípicos, que podrían representar ventajas adaptativas para la supervivencia ambiental y la patogénesis. Por lo tanto, este estudio contribuirá al entendimiento de la evolución, adaptación, biología y potencial epidemiológico de este patógeno mirando más allá de las cepas prototipo.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Caracterizar a nivel genómico y fenotípico los aislados de *S. Typhimurium* pertenecientes al genotipo emergente ST213.

5.2. Objetivos específicos

- Analizar la diversidad del genoma accesorio y la distribución geográfica del genotipo ST213.
- Determinar la historia evolutiva del genotipo ST213 en un contexto filogenético.
- Explorar fenotipos asociados a la supervivencia ambiental de los aislados de *S. Typhimurium* ST213.
- Evaluar la adhesión, internalización y supervivencia intracelular en modelos celulares in vitro (células epiteliales y macrófagos) de las cepas ST213 en comparación con la cepa prototipo ST19.

6. Materiales y métodos

6.1. Análisis filogenéticos

Para los análisis filogenéticos se emplearon 275 genomas de *S. Typhimurium* ST213, los genomas fueron obtenidos de la EnteroBase, específicamente de la base de datos de *Salmonella*. Se recuperaron todos los genomas identificados como genotipo ST213, se seleccionaron aquellos que contaban con un ensamble de alta calidad acorde con los parámetros de calidad determinados por la EnteroBase (4 Mbp – 5.8 Mbp, >20kb valor N50 y <600 contigs) y se descartaron aquellos identificados como redundantes^{14,32}. De los 275 genomas, 270 fueron proyectos genómicos y 5 genomas completos, adicionalmente se incluyeron 5 genomas de cepas genotipo ST19, 5 ST313 y 5 ST34, los cuales fueron obtenidos de la base de datos GenBank del NCBI³³ o de la EnteroBase. Los metadatos se encuentran disponibles en el **Anexo 1**.

Para construir la filogenia basada en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del cromosoma completo con los genomas de las cepas de interés, los 290 genomas fueron alineados con el genoma de cepa de *S. Typhimurium* SL1344 (Número de acceso GenBank: FQ312003.1), la cual es ampliamente usada como cepa de referencia en el campo de investigación. Los SNPs, fueron localizados, extraídos y filtrados usando PhaME (v1.0.2)³⁴. Para construir el árbol filogenético de los SNPs extraídos del genoma core (10208 bases) se determinó el modelo de sustitución óptimo y se construyó el árbol empleando MEGA (V11)³⁵, el modelo más adecuado fue Kimura 2-parameter³⁶. El árbol filogenético se enraizó al nodo del genoma de referencia y se verificó usando *bootstrapping* con 100 réplicas. Para identificar a las subpoblaciones en la filogenia se usó el algoritmo FastBAPs (v1.0.8)³⁷ con los siguientes parámetros: multiple res baps con la suposición estándar y 2 niveles, la visualización de los resultados se realizó con el paquete ggtree (v3.4.0)³⁸. Los análisis fueron realizados en Rstudio (v2022.07.2+576) con la versión 4.2.1 de R base^{39,40}.

Para la filogenia datada construida para explorar la historia evolutiva del genotipo ST213, se usó CSI phylogeny (V1.4)⁴¹, con 218 genomas ST213 que contaban con el año de colección, el árbol filogenético se construyó como se describió

previamente, la estimación de la divergencia entre los linajes se realizó usando el método no bayesiano RTDT-RelTime-ML incluido en MEGA (V11), el cual calcula tiempos estimados de divergencia basado en las fechas de aislamiento de las cepas estudiadas usando un reloj relajado sin usar ninguna suposición previa, únicamente las fechas absolutas^{35,42}. Los años de colección fueron usados como referencias y el árbol filogenético se enraizó a la cepa de referencia más antigua (*S. Typhimurium* LT2; número de acceso GenBank: NC_003197.2). Los resultados del análisis con la información detallada por nodo se encuentran disponibles en el **Anexo 2**.

Para el análisis de los loci CRISPR, los espaciadores se extrajeron usando la herramienta online CRISPRCasFinder⁴³, enseguida se usó la herramienta de tipificación para CRISPR de la plataforma Galaxy para nombrar a los espaciadores identificados⁴⁴. Para obtener una visión general de la agrupación de las cepas acorde con el perfil de los espaciadores que contenían se usó un el algoritmo de agrupación jerárquica nativo de R, usando una matriz de datos binarios. Adicionalmente los espaciadores se acoplaron al árbol filogenético como metadatos para confirmar las agrupaciones de los aislados. Todas las visualizaciones y anotaciones de los árboles filogenéticos se realizaron con iTOL (v6)⁴⁵.

6.2. Análisis del genoma accesorio

Los 290 genomas ensamblados se analizaron para caracterizar el genoma accesorio de los aislados. Para encontrar los genes involucrados en la resistencia a antibióticos se usó la base de datos ResFinder (v4)⁴⁶. Los replicones en los proyectos genómicos se identificaron usando la base de datos PlasmidFinder (v2.1)⁴⁷ con los parámetros estándar, debido a la falta de algunos replicones en la base de datos se realizó una búsqueda personalizada para el replicón del episoma D6-like que contienen algunas cepas ST213, para ello se usó como referencia el gen *repB* de la secuencia NZ_CP011430.1, con la base de datos personalizada se usó MyDbFinder (v2.0)⁴⁸ para localizar el replicón en el resto de los genomas. Además, se usó la base de datos VFDB⁴⁹ para identificar la presencia o ausencia de genes relacionados con la virulencia. Los profagos completos e incompletos fueron identificados usando Phaster⁵⁰.

Con los resultados obtenidos se generaron matrices binarias indicando presencia, ausencia o fracciones y se encuentran disponibles en los **Anexos 3-5**, para visualizar los resultados se generaron mapas de calor en RStudio (v2022.07.2+576) con R base (v4.2.1) y el paquete ggplot2 (v3.3.6)^{39,40,51}. Las visualizaciones que se acompañan con árboles filogenéticos fueron construidas en iTOL (v6)⁴⁵.

6.3. Cepas y condiciones de cultivo

Las cepas empleadas para los análisis fenotípicos se listan en la **Tabla 1**. Todas las cepas fueron cultivadas en agar LB (Luria-Bertani; 1% Bacto Triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl y 1.5% Bacto agar) con 60 µg/mL de cloranfenicol (todas las cepas ST213 excepto la cepa SLHS-03-15), 10 µg/mL de gentamicina (YUHS-03-80a) o 50 µg/mL de estreptomina (para las cepas ST19 y la cepa SLHS-03-15) y se incubaron por 16 h a 37°C. Los preinóculos se prepararon inoculando colonias individuales de cada cepa en 5 mL de caldo LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) por 16 h-18 h.

6.4. Construcción de cepas mutantes

Las cepas mutantes se construyeron usando la técnica de intercambio alélico en dos pasos⁵². Para generar la construcción se amplificaron por PCR dos fragmentos, el primero (F1) 700 pb río arriba del ATG del gen de interés (*hilD*) y el segundo (F2) 700 pb río abajo del codón de paro del gen usando como templado el ADN de la cepa 33676. Los fragmentos se digirieron con las enzimas correspondientes y ambos se ligaron con el vector pRE118 digerido. Las ligaciones se transformaron por electroporación en la cepa S17-1 λ pir (competente), la construcción en el plásmido pRE118 (pRE118:: Δ *hilD*) se verificó por PCR y secuenciación.

Las cepas ST213 se transformaron por conjugación con la cepa S17-1 pRE118:: Δ *hilD* en una relación 10:1 donadora (S17-1 λ pir):receptora (ST213). Las clones transconjugantes fueron seleccionadas en placas con 60 µg/mL de cloranfenicol y 60 µg/mL de kanamicina o para la cepa SLHS-03-15 con 200 µg/mL de carbenicilina y 60 µg/mL de kanamicina, se verificaron por PCR y una colonia seleccionada se cultivó por 20 h en 2 mL de caldo LB sin antibióticos a 37°C en

agitación (200 rpm). Transcurrido el tiempo, 20 µL del cultivo se añadieron a 2 mL de LB sin antibióticos y se incubaron por 4 h a 37°C en agitación (200 rpm). Enseguida se realizaron diluciones seriadas y 100 µL de la dilución 10⁻⁵ se plaqueó en agar LB sin antibióticos y se incubaron 37°C toda la noche, mientras que la dilución 10⁻² se plaqueó en agar LB sin NaCl con 10% de sacarosa, las placas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Las placas de agar con sacarosa que contenían 1000 veces menos colonias que las placas de agar LB fueron seleccionadas para el paso siguiente.

Las colonias seleccionadas fueron parchadas por duplicado en placas de agar LB con NaCl con 10% de sacarosa y en placas de agar LB con 60 µg/mL de kanamicina, y se incubaron toda la noche. Después del tiempo de incubación se seleccionaron aquellas colonias sensibles a kanamicina y se verificó por PCR y secuenciación la ausencia del gen de interés. Los oligonucleótidos usados se listan en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo	Referencia
SL1344	ST19, Stp ^R	CL
YUHS-02-75	ST213, MDR	24
SLHS-03-15	ST213, MDR	24
YUHS-03-80a	ST19, MDR	24
YUHS-03-80b	ST213, MDR	24
YUHS-04-31	ST213, MDR	24
YUHS-04-50	ST213, MDR	24
YUHS-05-26a	ST213, MDR	24
YUHS-05-26b	ST213, MDR	24
YUHS-05-75	ST213, MDR	24
YUHS-05-78	ST213, MDR	24
YUHS-07-18	ST213, MDR	53
33676	ST213, MDR	28
SL1344 $\Delta hilD$	ST19, $\Delta hilD$, Stp ^R , Km ^R	CL
SLHS-03-15 $\Delta hilD$	ST213, $\Delta hilD$	Este estudio
YUHS-05-78 $\Delta hilD$	ST213, $\Delta hilD$	Este estudio
YUHS-07-18 $\Delta hilD$	ST213, $\Delta hilD$	Este estudio
33676 $\Delta hilD$	ST213, $\Delta hilD$	Este estudio
14028	ST19, Stp ^R	CL
14028 $\Delta ompA$	ST19, $\Delta ompA$, Stp ^R , km ^R	CL
14028 $\Delta ompC/F$	ST19, $\Delta ompC/F$, Stp ^R , km ^R	CL
14028 $\Delta ompD$	ST19, $\Delta ompD$, Stp ^R , km ^R	CL

Tabla 1. Lista de cepas bacterianas empleadas en este estudio para los análisis fenotípicos. MDR (resistente a múltiples antibióticos), Stp^R (resistencia a estreptomycin), Km^R (resistencia a kanamicina), CL (colección del laboratorio).

Tabla 2. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción
Fw1-hilD	GCTTCTAGAGCACCCACGGCT	XbaI
Rv1-hilD	TTAATGGTTTCGCCATTTTTATGAATGTCGATG GGTACCGATGACTATTACTTACAAAGGTTACA TTTTCCAT ATGGAAAATGTAACCTTTGTAAGTAATAGTCAT	KpnI
Fw2-hilD	CGGTACCCATCGACATTCATAAAAATGGCGA ACCATTA	KpnI
Rv2-hilD	TTTTTGAGCTCTAAATGCTGCTTATTATAT	SacI

6.5. Formación y análisis de macrocolonias RDAR

La visualización del morfotipo RDAR se realizó en placas de agar LB sin NaCl, 40 µg/mL de rojo Congo y 20 µg/mL de azul de Coomassie R-250, en el centro de cada placa se colocaron 20 µL de preinóculo de cada cepa⁵⁴. Las placas se incubaron en la oscuridad a 20°C y se fotografiaron cada 5, 7 o 12 días. El análisis semicuantitativo de las macrocolonias se realizó usando el software FIJI⁵⁵, primero las imágenes fueron separadas en canales, el canal rojo fue seleccionado para contar las crestas, los anillos y medir el área. Para distinguir de forma clara las crestas y anillos, del fondo de la macrocolonia, se ajustaron los umbrales y se realizó un conteo manual. Escalando los valores numéricos de las variables seleccionadas (número de anillos, número de crestas y área) se elaboró un análisis de agrupación jerárquica en RStudio (v2022.07.2+576) con la versión 4.2.1 de R base^{39,40}. Los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado.

Para cuantificar la fijación de rojo congo por cada macrocolonia, se siguió el protocolo descrito arriba con algunas modificaciones; las placas de agar LB sin NaCl no contenían colorantes y las macrocolonias se removieron de las placas a los 5, 7 o 12 días y se resuspendieron en PBS estéril. La suspensión se centrifugó a 13000 rpm por 3min a temperatura ambiente, enseguida la pastilla se resuspendió en 1 mL de una solución de rojo congo (1 mg/mL) y se incubó por 90 min con agitación (900 rpm) a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron a 13000 rpm, después se tomaron 100 µL del sobrenadante para medir la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas (GloMax®-Multi Detection System)⁵⁶. Para determinar la concentración del colorante fijado se usó una curva estándar de rojo congo con valores desde 1 µg/mL hasta 1 mg/mL usando PBS

como diluyente. Los experimentos se realizaron por triplicado con dos réplicas técnicas. Los resultados se representaron en un mapa de calor construido en RStudio (v2022.07.2+576) con la versión 4.2.1 de R base y la colección Tidyverse (v1.3.1)^{39,40,57}.

Para encontrar asociaciones entre la fijación de rojo congo y las variables involucradas en la formación del morfotipo RDAR se realizó un análisis de correlación de Pearson en RStudio (v2022.07.2+576) con la función `cor` de R base (v4.2.1) y el paquete `Corrplot` (v0.92)^{39,40,58}.

6.6. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas se evaluó usando el ensayo de cristal violeta como se ha descrito previamente⁵⁹. Los preinóculos de cada cepa se diluyeron 1:100 en caldo LB sin NaCl. 100 μ L de cada dilución fueron transferidos a una placa de 96 pozos. Se prepararon tres placas de 96 pozos por cada experimento independiente para evaluar a formación de biopelículas a los 5, 7 y 12 días y se incubaron a 20°C en estático. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la densidad óptica (DO_{600}) y las placas se lavaron tres veces con agua destilada previo a su fijación. Las biopelículas se fijaron con 200 μ L de metanol por 15 min y después se dejaron secar por 15 min a temperatura ambiente. Las biopelículas se tiñeron con 200 μ L de solución acuosa de cristal violeta (0.2%) por 10min, enseguida se lavaron con agua destilada y se dejaron secar.

Para cuantificar la formación de biopelícula se añadieron 125 μ L de solución acuosa de ácido acético (33%), transcurridos 15 min se midieron las DO_{560} . La formación de biopelícula se calculó como el cociente de DO_{560}/DO_{600} . Se realizaron tres experimentos independientes con seis réplicas técnicas. Los resultados se resumieron en un mapa de calor con los valores escalados usando RStudio (v2022.07.2+576) con R base (v4.2.1) y la colección Tidyverse (v1.3.1)^{39,40,57}.

6.7. Cultivo de células eucariotas

Los fibroblastos murinos (MEF) se crecieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich) suplementado con 1 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich), 1.5 g/L $NaHCO_3$ y 10% v/v de suero fetal inactivado por calor

(Byproducts). Las células de epitelio intestinal C2BBE1 (ATCC® CRL-2102™) fueron cultivadas en DMEM Advanced (Gibco™) y suplementado con 200 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 10% (v/v) de suero fetal bovino. Las células intestinales HT29 (ATCC® HTB-38™) se mantuvieron en medio McCoy's 5A (Sigma-Aldrich) suplementado con 1.5 g/L de NaHCO₃ y 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor. Las líneas celulares de monocitos THP-1 (ATCC® TIB-2™) y U-937 (ATCC® CRL-1593.2™) se crecieron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 media, Sigma-Aldrich) suplementado con 200 mM de L-glutamina y 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado por calor.

Un día previo a los experimentos los fibroblastos y las células C2BBE1 se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 2.6×10^6 células/mL por pozo^{60,61}. Mientras que las células HT-29 se comenzaron a diferenciar 6 d a 7 d antes de sembrarse en placas de 24 pozos. Para diferenciar estas células en una monocapa mixta conformada por células columnares y enterocitos, el medio de mantenimiento (McCoy's 5A) fue removido cuando las células alcanzaron una confluencia del 60% (1.5×10^5 células/mL) y se sustituyó por DMEM con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 20 mM de glucosa, 1 mM de galactosa y libre de piruvato, el proceso de diferenciación es paulatino para evitar la muerte celular, por lo cual se siguió la agenda indicada en la **Tabla 3**. Transcurrido el día 4 de la agenda el medio fue reemplazado por DMEM con 10 mM de galactosa y 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2 d después se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 2×10^5 células/mL por pozo y se incubaron por 25-30 días cambiando el medio dos veces por semana⁶². Los monocitos fueron sembrados en placas de 24 pozos a una densidad de 6.5×10^6 células/mL por pozo y se diferenciaron a macrófagos con forbol 12-miristato 12-acetato (PMA, Sigma-Aldrich). Para los THP-1; se añadió medio con 20ng/mL de PMA y las células se incubaron por 72 h, 12 h-18 h antes de los experimentos el medio con PMA se reemplazó con medio fresco libre de PMA⁶³. Para las células U-937 se usó medio con 30ng/mL de PMA y las células se incubaron por 48 h, trascurrido el tiempo el medio fue reemplazado por medio libre de PMA y se incubaron por 5 d cambiando el medio cada dos días⁶⁴.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Nunca se permitió que las células alcanzaran más de 9x10⁵ células/mL. Los experimentos se realizaron con líneas celulares entre los pases 4-15.

Tabla 3. Agenda para diferenciación de células HT29

Día	Glucosa	Galactosa
0	20mM	1mM
1	15mM	1mM
2	10mM	3mM
3	5mM	4mM
4	0	5mM

Tabla 3. Guía de diferenciación para las células HT29 indicando los cambios en el contenido de carbohidratos en el medio por día.

6.8. Ensayos de infección en células eucariotas y cuantificación de LDH

Las infecciones a células eucariotas se realizaron usando ensayos de protección a aminoglucósidos. 300 µL de preinóculo de cada cepa se diluyeron en 10 mL de caldo LB sin antibióticos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, y se incubaron 3.5h a 37°C con agitación (200 rpm). Enseguida 1mL de cada cultivo bacteriano fue centrifugado a 8000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS estéril⁶⁵. Las infecciones se realizaron en placas de 24 pozos preparadas como se describe en la sección 6.7.

Todas las líneas celulares se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 y se incubaron por 20min a 37°C en una atmosfera con 5% de CO₂. Después de la incubación las monocapas celulares se lavaron tres veces con PBS estéril y se añadieron 500 µL de medio (el correspondiente a cada línea celular) con 100 µg/mL de gentamicina o amikacina (para las cepas 33676, YUHS-04-50 y YUHS-03-80a) y se incubaron 2 h para eliminar las bacterias extracelulares, y posteriormente cuantificar la invasión bacteriana. Para la replicación se siguió el mismo protocolo, con ajustes, a cada pozo se le añadieron 500 µL de medio con 10 µg/mL de gentamicina o 25 µg/mL de amikacina y se incubaron por 18 h. Después de los periodos de incubación las monocapas se lavaron tres veces con PBS estéril y enseguida se añadieron 100 µL de solución de lisis (1% (v/v) Triton X-100 (Bio-Rad), 0.1% (v/v) SDS (Bio-Rad) en PBS) y se incubaron por 3 min, finalmente se agregaron 400 µL de PBS a cada pozo y se contaron las bacterias intracelulares

viables usando la técnica descrita por Chen Y. C., et. al⁶⁶. La tasa de invasión se calculó como la relación entre las CFU/mL a las 2 h entre las CFU/mL del inoculo usado para la infección multiplicado por 100. La tasa de replicación se calculó como el cociente entre las CFU/mL a las 18h entre las CFU/mL a las 2 h⁶⁷.

En el caso de los índices de competencia se realizaron los mismos procedimientos descritos arriba con la diferencia de que el inóculo consistió en una mezcla 1:1 de las cepas de interés, y el procedimiento de conteo se realizó en placas con 20 µg/mL de gentamicina y en placas sin antibióticos. Los cálculos se hicieron dividiendo las CFU/mL de la cepa resistente a gentamicina entre las CFU/mL de la cepa sensible⁶⁸.

Para los ensayos de adhesión, las células fueron tratadas con 1 µg/mL de citocalasina D por 1 h. Las monocapas se infectaron a un MOI de 10 por 30 min y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂, transcurrido el tiempo de incubación las células se lisaron y se contaron las CFU/mL de las bacterias adheridas. El porcentaje de adhesión se calculó como el cociente entre las CFU/mL a los 30 min entre las CFU/mL del inoculo multiplicado por 100⁶⁹.

La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se cuantificó como una medida indirecta de la citotoxicidad usando el kit CytoTox 96 Non radioactive (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor, los cultivos se infectaron tal como se describe arriba y 3 h y 21 h después de la infección (p.i.) se colectaron los sobrenadantes. Como control se usaron células no infectadas y lisadas con Triton X-100. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como el cociente de la liberación de LDH de las muestras entre la liberación de LDH de las células no infectadas multiplicado por 100.

Para todos los experimentos se realizaron al menos tres experimentos independientes con dos réplicas técnicas. El análisis estadístico realizado consistió en aplicar la prueba Kruskal–Wallis seguido de la prueba de Wilcoxon para identificar diferencias entre las cepas. La significancia estadística se determinó a $p < 0.05$. Las gráficas y los análisis estadísticos se realizaron en RStudio (v2022.07.2+576) con R base versión 4.2.1, la colección Tidyverse (v1.3.1), y el paquete ggpubr (v0.4.4)^{39,40,51,57}.

6.9. Ensayos de motilidad

Para los ensayos de motilidad los preinóculos de cada cepa fueron ajustados a la densidad óptica (DO, 600nm) de 2, enseguida se colocaron por punción, aproximadamente 3 μ L de cada cultivo ajustado en el centro de placas de agar suave (LB, 0.3% Bacto agar). Las placas se incubaron por 5 h a 37°C, enseguida se fotografiaron y el diámetro de nado se midió digitalmente usando el software FIJI⁵⁵. Para los ensayos de exclusión en nado se realizó el mismo procedimiento, con la diferencia de que dos cepas se colocaron en la misma placa, las punciones se realizaron a 1 cm de distancia una de la otra y se incubaron por 24 h. Las gráficas y los análisis estadísticos (prueba de Kruskal-Wallis) se realizaron en Rstudio (v2022.07.2+576) con R base (v4.2.1)^{39,40}.

6.10. Perfiles de proteínas secretadas y de membrana externa

Para las proteínas secretadas, los cultivos bacterianos se prepararon a partir de colonias individuales, las cuales se resuspendieron en caldo LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron por 13 h en agitación (200rpm) a 37°C. 3 mL de los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se recuperaron por centrifugación (12000 rpm), se les añadieron 320 μ L de ácido tricloroacético y se incubaron por 1 h a 4°C. Enseguida las muestras se centrifugaron a 14000 rpm por 30 min y se descartaron los sobrenadantes, las pastillas se lavaron con 1 mL de acetona y después se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min, se removió la acetona y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Para resuspender la pastilla se emplearon 10 μ L de buffer de proteínas Laemmli 4X y 2 μ L de TRIS pH 11.¹⁷⁰.

Para las proteínas de membrana externa los cultivos bacterianos se prepararon a partir de colonias individuales, se resuspendieron en caldo LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron toda la noche en agitación (200 rpm) a 37°C. 1.5 mL de los cultivos bacterianos se concentraron por centrifugación (3 min a 12000 rpm) y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) y la muestra fue sonicada hasta que se clarificó, enseguida se centrifugó por 2 min a 12000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó por 30 min a 4°C, y se descartó. La pastilla se resuspendió en 500 μ L de 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) /2% Triton X-100 y se incubó por 30min a 37°C. Enseguida la

muestra se centrifugó por 30 min a 12000 rpm (4°C) y la pastilla se resuspendió en 500 µL de 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), se centrifugó nuevamente por 30 min a 4°C (12000) y finalmente la pastilla se resuspendió en 50 µL de PBS. La concentración proteica se midió usando el método del BCA y 15 µg/µL se mezclaron con 10 µL de buffer de proteínas Laemmli 4X.

Todas las muestras proteicas se calentaron por 10min a 90°C y se visualizaron por SDS-PAGE en geles de 12% de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie.

7. Resultados

7.1. Exploración de la estructura poblacional, distribución geográfica e historia evolutiva del genotipo ST213 de *S. Typhimurium*.

7.1.1. La estructura poblacional del genotipo ST213 muestra evidencia de evolución intra-genotipo.

Para delimitar la estructura poblacional del genotipo ST213 de *S. Typhimurium*, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) basado en los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés) identificados en el cromosoma de 275 cepas ST213. Esta colección de genomas está conformada por 43 cepas pertenecientes a la colección de J. L. Puente/E. Calva que fueron aisladas entre 2002 y 2005, por M. B. Zaidi durante un programa de vigilancia epidemiológica acoplada a la cadena alimenticia y que fueron secuenciados en el contexto del proyecto “UoWUCC 10K genomes”^{24,71}, 5 genomas completos de cepas representativas de esta colección que fueron secuenciadas previamente^{31,72,73}, y 232 genomas disponibles de forma pública en la base de datos de *Salmonella* de la EnteroBase^{14,71}, colectados entre 1957 y 2022 en 13 países diferentes. Se incluyeron 15 genomas de *S. Typhimurium* representativos de otros genotipos de interés; 5 de cepas pertenecientes al genotipo de referencia ST19, 5 genomas ST313 y 5 genomas ST34.

Se realizó un análisis de agrupación con el algoritmo FastBAPs usando el alineamiento de los SNPs de las 290 cepas, el cual permitió identificar 5 clústeres los cuales coincidieron con la estructura de la filogenia. En el primer clúster (C1) se agruparon las cepas de referencia ST19 y las cepas representativas del genotipo ST313, mientras que los clústeres C2, C3 y C4 incluyeron a los aislados ST213 aislados principalmente de Asia (India, Tailandia y Vietnam) y el noreste de Europa (Bélgica, Dinamarca, Holanda, Francia y Reino Unido). El quinto clúster (C5) fue el más grande, conformado por 188 cepas incluyendo a las 5 cepas representativas del genotipo ST34, el 96.6% (n=172) del total de los aislados fueron de Norteamérica, y únicamente 16% (n=16) aislados de otros continentes (**Fig. 3A-B**). Con el fin de facilitar la discusión, y en concordancia con los resultados obtenidos nos referiremos a los clústeres C2-C4 como EU-ST213 y al clúster C5 como NA-ST213.

Las cepas NA-ST213 además de ser el subgrupo más abundante de la muestra presentan características interesantes tal como, la ausencia del plásmido de virulencia (pSTV) identificado en las cepas de referencia de *S. Typhimurium* y la presencia de plásmidos de la familia IncC asociados a los altos perfiles de resistencia a antimicrobianos (AMR) de estas cepas, además algunas cepas se han asociado a infecciones invasivas⁷⁴, es importante mencionar que en este clúster (C5) se agruparon las cepas ST34 incluidas en el estudio, relacionándolas estrechamente con las cepas ST213, el genotipo ST34 se ha considerado un riesgo para la salud pública en los últimos años debido a su asociación con infecciones gastrointestinales alrededor del mundo⁷⁵. Por lo anterior, se decidió caracterizarlo más a profundidad. Usando la información del segundo nivel obtenida con el análisis de agrupación de FastBAPs se identificaron 4 linajes (no se consideraron las cepas ST34 dentro de los linajes). El linaje 1 (19.1%), está conformado por cepas de humanos y ganado bovino aisladas en Estados Unidos de América (USA) y Canadá (CA). El linaje 2 fue el más abundante de la muestra (43.6%) y sus aislados provienen de un amplio rango de hospederos de Canadá, USA y México. Al igual que el linaje anterior, cepas pertenecientes al linaje 3 (26.6%) se han encontrado en Canadá, USA y México; sin embargo, estas han sido aisladas principalmente de humanos. Por su parte el linaje 4 (10.6%) incluye principalmente aislados de agua/ríos colectados en USA y México (**Fig. 3B y anexo 1**).

En conjunto estos resultados revelan una evolución independiente de este genotipo acorde con la región geográfica de aislamiento; por un lado, los aislados de la región europea y asiática y por otro los de Norteamérica. Si bien, esta separación geográfica es normal desafía el poder discriminatorio que ofrece el MLST, además la diversificación de las cepas NA-ST213 en cuatro linajes refleja la plasticidad de este genotipo para evolucionar y adaptarse, adquiriendo elementos génicos que pueden mejorar sus habilidades para sobrevivir en el ambiente o en sus hospederos. Esto resalta la necesidad de monitorear a este genotipo emergente para implementar medidas de prevención y control antes de que las cepas de Norteamérica se diseminen a otras regiones del mundo, como se ha observado con las cepas ST34⁷⁵.

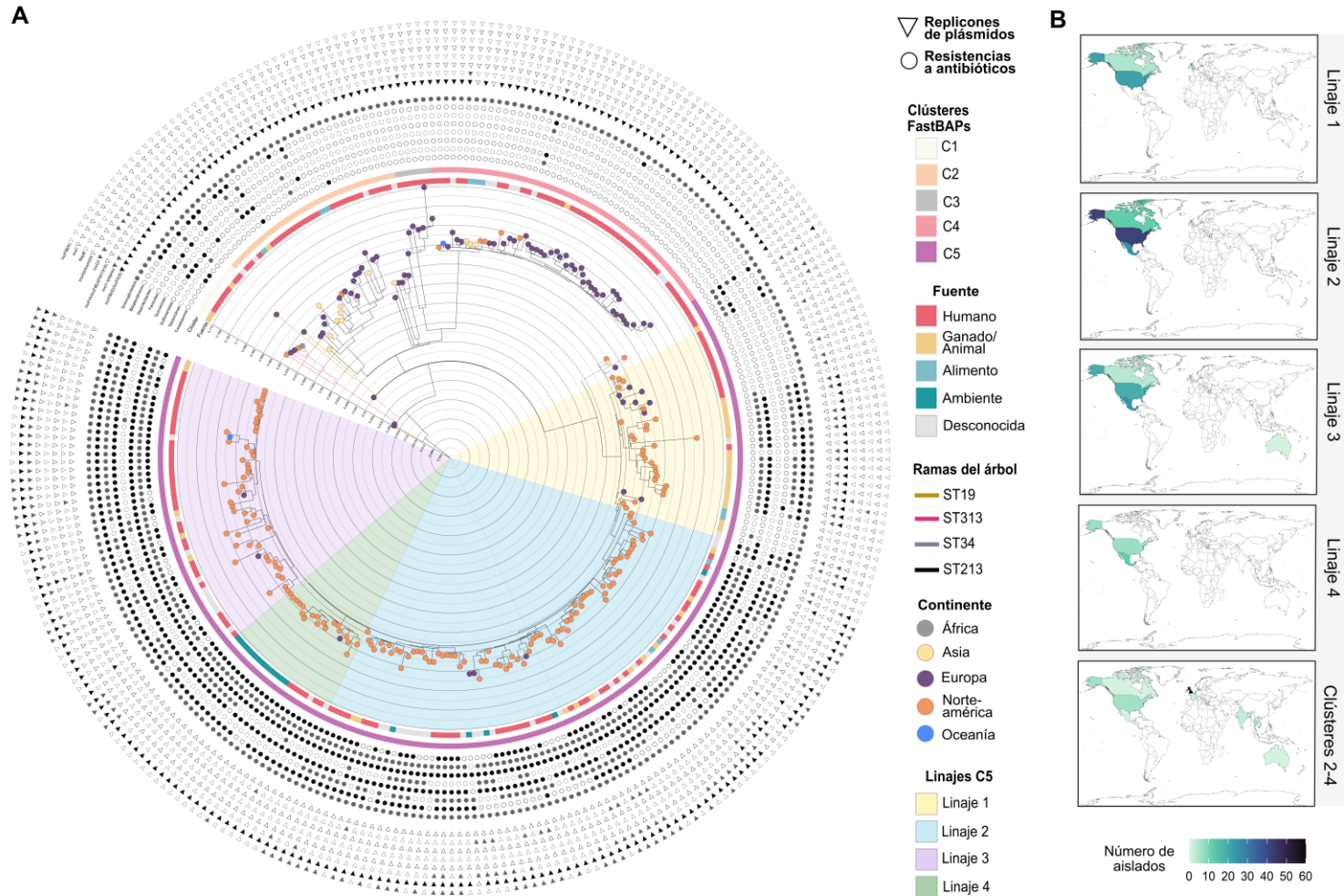


Figura 3| Estructura poblacional y repertorio del genoma accesorio de las cepas del genotipo ST213. A. Árbol filogenético de máxima verosimilitud ($n=290$) en donde se muestran los grupos, linajes, perfiles de MDR (círculos rellenos indican presencia de la resistencia) y el repertorio de plásmidos del genotipo ST213 (triángulos rellenos indican presencia del replicón). Se incluyen 5 cepas de referencia ST19 (ramas doradas), 5 ST313 (ramas rosas) y 5 ST34 (ramas grises). **B.** Distribución geográfica por país de los clústeres C2-C4 y linajes 1-4 del clúster C5 de las cepas NA-ST213 y EU-ST213. El gradiente de color indica el número de aislados.

7.1.2. La adquisición de genoma accesorio a través de múltiples eventos de transferencia horizontal ha diversificado geográficamente al genotipo ST213.

Para explorar a detalle el perfil micro evolutivo de este genotipo se analizó el contenido de su genoma accesorio, el cual puede conferir funcionalidades relevantes a la bacteria, tales como resistencia a antibióticos, mecanismos de virulencia y capacidades de adaptación ambiental⁷⁶.

Primero para confirmar la diversidad intra-genotipo asociada a la distribución geográfica de las cepas ST213, éstas se subclasificaron con base en el contenido de secuencias denominadas espaciadores en los *loci* CRISPR. Los espaciadores son segmentos de DNA únicos adquiridos de fagos que previamente infectaron a la bacteria y forman parte del sistema de inmunidad adaptativo de las bacterias. Esta tipificación posee mayor poder discriminativo que la clasificación por MLST; además, permite identificar relaciones genéticas entre los aislados y su posible microevolución asociada a la presión selectiva de un espacio geográfico común⁴⁴.

En este análisis se observó que el patrón de los espaciadores es congruente con el árbol filogenético de máxima verosimilitud construido previamente (**Fig. 3A**, **Fig. 4A**); sin embargo, al agrupar los aislados acorde con los patrones de los espaciadores se puede observar que los grupos C2 y C3 de las cepas EU-ST213 contienen aislados con espaciadores más diversos (**Fig. 4B**), en coherencia con que sus aislados fueron colectados en los años más distantes y provienen de regiones geográficas variadas en comparación con los grupos C4 (EU-ST213) y C5 (NA-ST213). En general los espaciadores en el locus CRISPR1 mostraron baja variabilidad, no obstante, los contenidos en el locus CRISPR2 fueron altamente variables entre los grupos de aislados EU-ST213 y NA-ST213. De forma interesante las cepas NA-ST213 contienen dos espaciadores singulares, STMB34 y HadB20 (**Fig. 4A**), cuyos blancos no han sido caracterizados; no obstante, una observación importante es que estos espaciadores son compartidos con el genotipo ST34. Esto resulta interesante porque las cepas ST34, al igual que las cepas NA-ST213, carecen del plásmido de virulencia pSTV y presentan perfiles de multi-resistencia a antibióticos (MDR). Más aún, el genotipo ST34 es uno de los principales agentes causales de gastroenteritis en Europa, Asia y Oceanía, su expansión ha sido rápida

y ha llegado a ser denominada “la clona pandémica”^{15,77,78}, estos resultados confirman la relación filogenética entre este genotipo y las cepas NA-ST213, esto debido a que se ha propuesto que los arreglos CRISPR en *Salmonella* ya no son funcionales y por ende no hay integración de espaciadores nuevos, por lo cual se pueden establecer relaciones filogenéticas precisas en el contexto de la distribución global⁷⁹. Además, el hecho de que estas cepas compartan características es intrigante y saber si los espaciadores podrían estar relacionados con la ausencia de ciertos plásmidos, fagos, u otro contenido del genoma accesorio abre nuevos enfoques de investigación.

Por otro lado los elementos móviles como los bacteriófagos son altamente dinámicos y su adquisición, degradación y escisión pueden ayudar a entender los cambios genéticos, adaptativos así como parte de la historia evolutiva de las cepas ST213⁸⁰.

A este respecto, mediante el análisis del contenido de profagos en los genomas de las cepas ST213 incluidas en este estudio, se encontraron un total de 84 profagos completos e incompletos cuya distribución se correlaciona con los clústeres identificados previamente (**Fig. 5A**). El bacteriófago más prevalente entre todas las cepas, independientemente de su genotipo o zona geográfica, fue el profago *Gifsy-2* (92%), el cual se identificó completo, sin embargo, resultó interesante la identificación de un subgrupo de aislados NA-ST213 que carece de este profago (n=19), el cual está ampliamente distribuido en las cepas de *S. Typhimurium*. También fue relevante la observación, de que todas las cepas NA-ST213 a excepción de una, carecían del profago *Gifsy-1*, pero no las cepas ST34.

Los profagos *Gifsy-1* y *Gifsy-2* son relevantes debido a que contienen genes que codifican para determinantes de virulencia que son importantes para la supervivencia intracelular (*Gifsy-2*) o durante la colonización (*Gifsy-1*)^{81,82}. Una de las proteínas mejor caracterizadas codificadas por *Gifsy-1* es GogB, un efector antiinflamatorio que regula el daño al tejido intestinal inhibiendo la activación de NFκB⁸³. Las cepas NA-ST213 no poseen el gen *gogB* (**Fig. 5B**), aun cuando poseen un perfil de profagos particulares que no comparten con las cepas EU-ST213, ST19, ST34 y ST313, tales como, SE1, UAB_Phi20, P88 y P1 (**Fig. 5A**).

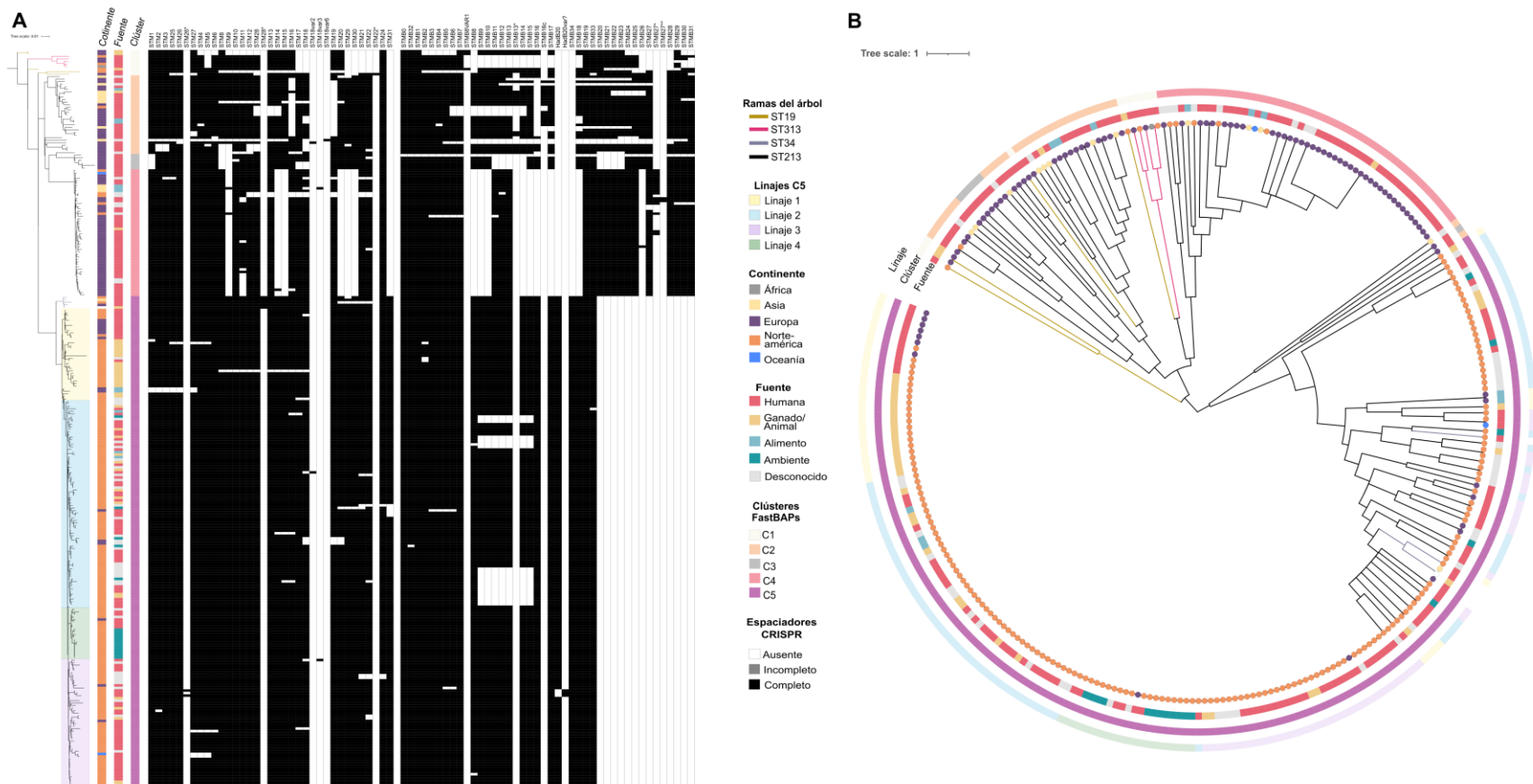


Figura 4| Diversidad de los espaciadores contenidos en los loci CRISPR del genotipo ST213. A. Árbol filogenético de máxima verosimilitud acoplado con los espaciadores del *loci* CRISPR. Los nombres de los espaciadores se encuentran en la parte superior, los espaciadores duplicados se nombran con un asterisco y aquellos que presentan SNPs están seguidos de "var", los rectángulos vacíos indican ausencia del espaciador. **B.** Análisis de agrupación de las cepas del genotipo ST213 acorde con su contenido de espaciadores. El análisis se realizó en Rstudio y en la imagen se muestran los grupos principales y los linajes de las cepas NA-ST213 (**Anexo 1**).

Ningún gen relacionado con virulencia, o que proporcione alguna ventaja adaptativa en general, se ha reportado o asociado directamente con estos bacteriófagos, cuya distribución es interesantemente heterogénea entre los diferentes aislados NA-ST213; por lo tanto, es necesario realizar investigaciones más detalladas para conocer el rol de estos profagos en su interacción con la bacteria. También se encontraron ampliamente distribuidas versiones incompletas de los profagos SFIV (74%) y SJ46 (72%) entre todas las cepas.

La variación en el repertorio de profagos muestra una clara segregación geográfica de las cepas ST213, además permite inferir que estos cambios pueden estar moldeando la evolución de los aislados de Norte América.

En estudios previos se reportó que una de las características distintivas de las cepas ST213 aisladas en México es que carecen del plásmido de virulencia (pSTV)^{25,28,31}, el cual contiene genes involucrados específicamente en la adhesión (*pefABCD*), invasión (*rck*, *spvAC*) y supervivencia intracelular (*mig-5*, *spvD*) de *S. Typhimurium*⁸⁴⁻⁸⁸. El análisis presentado en la **Figura 3A**, mostró que todas las cepas NA-ST213, carecen de este plásmido reforzando la noción de que su ausencia pudo haber sido un evento determinante en la emergencia del genotipo ST213. Sin embargo, la ausencia del pSTV no necesariamente implica la ausencia de los genes de virulencia asociados, algunos de estos genes han sido encontrados en otros plásmidos o en el cromosoma bacteriano^{89,90}, por lo que se analizó la posibilidad de que estuviesen localizados en otro elemento genómico usando la base de datos para genes de virulencia VFDB⁴⁹. Este análisis reveló que, en contraste con las cepas EU-ST213, las cepas NA-ST213 no contenían ninguno de los genes asociados al pSTV (**Fig. 5B**).

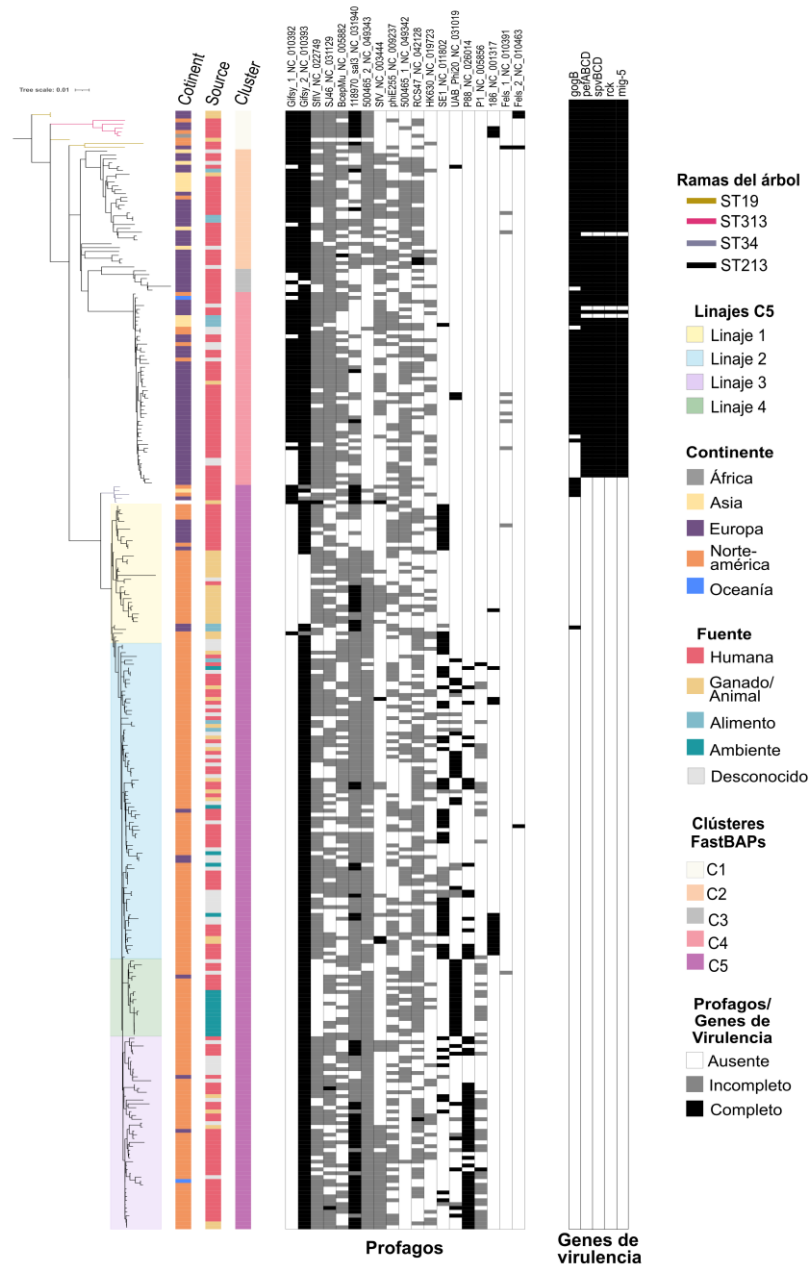


Figura 5| Repertorio de profagos y genes de virulencia de las cepas de *S. Typhimurium* ST213.
A. Árbol de máxima verosimilitud asociado a los profagos más abundantes identificados, se indican los profagos completos, ausentes e incompletos. Los resultados completos se encuentran disponibles en el **Anexo 3** **B.** Árbol de máxima verosimilitud asociado a genes de virulencia relevantes para la patogénesis de *S. Typhimurium*. Los rectángulos vacíos indican ausencia del gen, mientras que los rellenos indican presencia del gen. Los nombres de los genes se muestran en la parte superior.

En contraste con la ausencia de genes de virulencia conocidos (**Fig. 5B**), las cepas NA-ST213 presentaron un patrón de incremento gradual en las resistencias a antibióticos y desinfectantes, y a partir del linaje 2 todos los aislados mostraron un perfil de multi resistencia a antibióticos consistente (MDR, **Fig. 3A**). Se identificaron 58 genes de resistencia en todos los genomas analizados, los cuales mostraron paralelismo con el contenido de los replicones de plásmidos, mientras que las cepas EU-ST213 mostraron menos replicones y genes de resistencia en comparación con las cepas NA-ST213 (**Fig. 6A-B**). Lo anterior indica que la adquisición de los plásmidos contribuyó de forma importante a los amplios perfiles de MDR de las cepas NA-ST213, ya que presentan un repertorio más amplio de replicones. sin embargo, queda por definir si dichos plásmidos confirieron a las cepas ST213 otras ventajas adaptativas asociadas al ambiente o el hospedero.

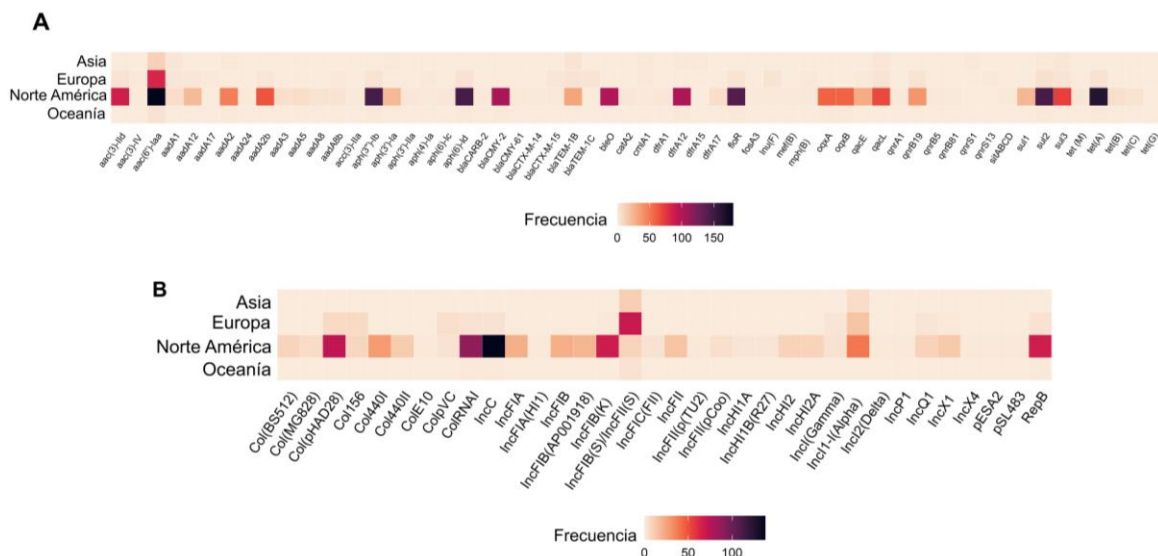


Figura 6| Frecuencia de determinantes de resistencia a antimicrobianos y plásmidos presentes en las cepas ST213. A. Heatmap que muestra la frecuencia de cada uno de los determinantes de resistencia antimicrobianos identificados en las cepas ST213 por continente. **B.** Heatmap que muestra la frecuencia de replicones de plásmidos identificados en las cepas ST213 por continente.

Las cepas NA-ST213 no sólo se distinguen por la ausencia del pSTV, el 76% de estos aislados poseen plásmidos de la familia IncC (n=143/188), mientras que ninguna cepa EU-ST213 lo tiene. La presencia de estos plásmidos en un porcentaje tan amplio de las cepas NA-ST213, nos llevó a indagar si era posible inferir la región geográfica de adquisición. A través de un análisis espaciotemporal usando los

genomas de las cepas que contaban con el año de aislamiento, se puede proponer que este plásmido está presente en cepas NA-ST213 desde el 2002 en México, de donde posteriormente se expandió a USA y Canadá con una distribución nula o limitada a otros continentes hasta la fecha (**Fig. 7A**). Los plásmidos IncC han sido principalmente relacionados con las resistencias a antibióticos²⁶; sin embargo, su alta incidencia no solo en este grupo de cepas, sino también en otras especies bacterianas o serovares de *Salmonella enterica* resalta la importancia de estudiarlos en el contexto de la virulencia y fisiología bacteriana.

7.1.3 La reconstrucción histórica del genotipo ST213 revela un detonante potencial para la expansión de las cepas NA-ST213.

Con el fin de indagar la historia evolutiva del genotipo ST213, así como su diversificación y distribución a través del tiempo, se infirió una filogenia datada usando el método RTDT-ML de MEGA (v11)^{35,42}. Para esta reconstrucción se usaron los 218 genomas que contaban con el año de aislamiento de la cepa. Los resultados mostraron que el ancestro común más reciente para este genotipo data aproximadamente de 1771 (95% intervalo de confianza (CI) 1608–1858; **Fig. 7B**). Las cepas EU-ST213 divergieron alrededor de 1813 (95% CI 1701–1884), específicamente el clúster C3 divergió cerca de 1819 (95% CI 1701–1909), seguido del clúster C2 alrededor de 1931 (95% CI 1852–1969) y finalmente el clúster C4 cerca de 1999 (95% CI 1964–2000), siendo el más joven genéticamente dentro de las cepas EU-ST213.

El clúster C5, conformado por las cepas NA-ST213, incluyó a las tres cepas más antiguas de esta colección, las cuales fueron aisladas en 1957, 1968 y 1988. De sus cuatro linajes, el linaje 1 divergió alrededor de 1954 (95% CI 1893–1956), y está representado por cepas que fueron aisladas principalmente de ganado en USA entre 2000-2006, desapareció de los muestreos por siete años y reapareció principalmente en humanos en Canadá (n=5) y UK (n=7) entre 2014 y 2021. Interesantemente, esta submuestra sugiere que la adquisición del profago Gifsy-2 generó un sub-linaje dentro del linaje 1 (**Fig. 7B**, los nodos se resaltaron en café).

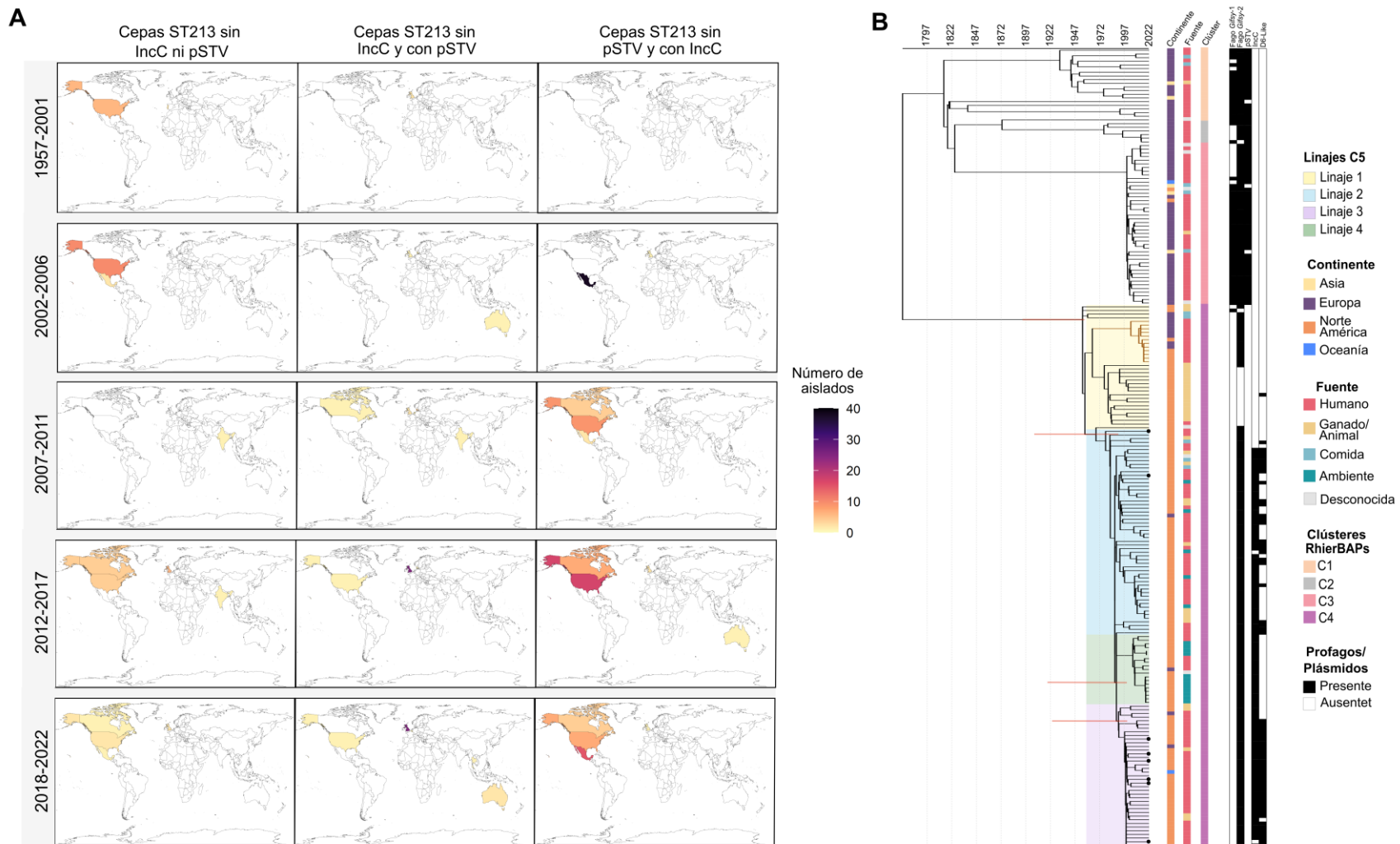


Figura 7 | Análisis espacio temporal del genotipo ST213. A. Visualización de la distribución espaciotemporal de los plásmidos pSTV e IncC en las cepas ST213. **B.** RelTime análisis mostrando la filogenia datada de 220 aislados de genotipo ST213, acoplado al contenido del genoma accesorio más relevante. Los intervalos de confianza (95% CI) de los nodos más importantes se muestran con líneas rojas. El sub-linaje 1 se resalta en café y las cepas relevantes para los estudios fenotípicos se indican con un círculo negro.

Los linajes 2 y 3 divergieron cerca de 1957 (95% CI 1893–1979) y 1989 (95% CI 1919–2000), respectivamente. El linaje 2 se ha mantenido hasta la fecha como el linaje más aislado, mientras que el linaje 3 no se ha aislado después del 2018. El linaje 4, que divergió aproximadamente en 1991 (95% CI 1924–2000) y su primer aislado data del 2012, es el más reciente entre las cepas NA-ST213, y se aisló más frecuentemente entre 2018 y 2021, lo cual podría implicar un posible reemplazo del linaje 3 (**Fig. 7B**).

Esta reconstrucción histórica acoplada al contenido de plásmidos muestra que el plásmido IncC no se encuentra en las cepas del linaje 1, nueve cepas del linaje 2 y solo una cepa de los linajes 3 y 4, lo que permite plantear que las cepas del linaje 2 adquirieron el plásmido IncC en alguna etapa de su evolución contribuyendo a su expansión y divergencia al conferirle la habilidad de sobrevivir a la exposición de diferentes antibióticos, lo que por ende incrementa potencialmente su transmisión (**Fig. 7B**). En conjunto, este análisis resalta la diversificación del genotipo ST213 a través del tiempo. Lamentablemente, debido a la ausencia de información geoespacial completa y datos clínicos, no se pueden determinar las dinámicas de transmisión de este genotipo.

7.2 Caracterización fenotípica de cepas de *S. Typhimurium* ST213.

7.2.1 Análisis genómico de las cepas NA-ST213 seleccionadas para las caracterizaciones fenotípicas.

Cepas NA-ST213 representativas de la colección de M. B. Zaidi fueron elegidas para posteriores análisis debido sus características genéticas, su distribución geográfica, su identificación en personas sintomáticas y asintomáticas, así como, su implicación como un riesgo para la salud pública y seguridad alimentaria. Se eligieron 4 cepas principales, mientras que otras 6 se usaron para confirmar fenotipos o ampliar observaciones, aisladas de humanos con infecciones, invasivas o gastrointestinales, colectadas en diferentes años y regiones. Entre las cepas elegidas se incluyó la cepa SLHS-03-15, la cual a diferencia del resto de las cepas no contenía plásmidos de la familia IncC (en el genoma de la cepa YUHS-02-75 no se identificó este plásmido, pero si por PCR). Además, todas las cepas presentaban diferentes perfiles en cuanto al contenido de fagos, lo cual nos permite

cubrir, en parte, la diversidad que existe dentro de las cepas NA-ST213. Con las cepas seleccionadas (**Figura 8A-C; Tabla 1**), se realizaron experimentos para evaluar si los elementos del genoma accesorio conferían algún fenotipo distintivo entre ellas mismas y cepas durante su interacción con células en cultivo o en torno a fenotipos que se asocian a la sobrevivencia ambiental o transmisión.

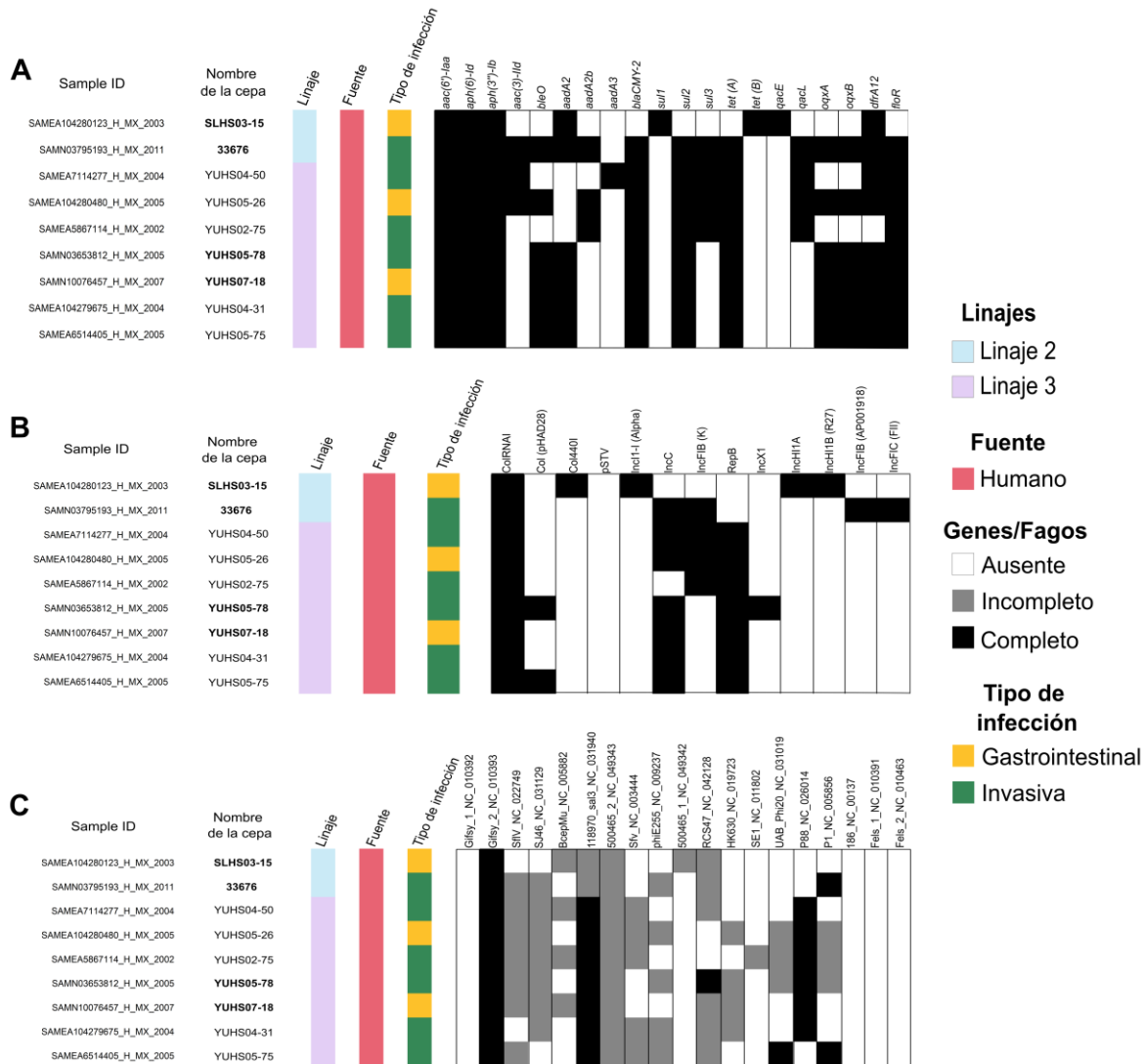


Figura 8 | Contenido del genoma accesorio de las cepas seleccionadas para los análisis fenotípicos. A. Genes de resistencia a antimicrobianos identificados en los genomas de las cepas. **B.** Contenido de replicones de plásmidos en los genomas analizados. **C.** Profagos más abundantes en la submuestra de genomas.

7.2.2 Las cepas del genotipo NA-ST213 forman biopelículas diversas.

Para evaluar la capacidad de supervivencia ambiental de las cepas ST213, se estudió su capacidad para formar el morfotipo RDAR (rojo, rugoso y seco por sus siglas en inglés). El morfotipo RDAR es un comportamiento multicelular en el cual la bacteria forma una matriz extracelular compuesta por fibras amiloides, celulosa y polisacáridos que le permite sobrevivir a diferentes estreses ambientales, tales como la desecación, antibióticos y escasez de nutrientes, características que potencian la transmisión y supervivencia del patógeno^{6,91}. Se usaron 10 cepas NA-ST213, tres cepas de referencia pertenecientes al genotipo ST19 que han sido ampliamente estudiadas y una de ellas (14028) ha sido la referencia para estudiar la formación de biopelículas en *S. Typhimurium*. Se incluyeron dos cepas de *E. coli* ($\Delta csgA$ y $\Delta csgD$) incapaces de formar el morfotipo RDAR.

Nueve de las cepas NA-ST213 y dos de las ST19 que se incluyeron en el estudio presentaron todas las características distintivas del morfotipo (**Fig. 9**), no obstante, presentaron patrones distintivos en la arquitectura de la macrocolonia. Para explorar las sutiles diferencias estructurales entre las macrocolonias se usó un enfoque semicuantitativo que permitió formar grupos entre las cepas acorde con el número de crestas y anillos y con el área total de la colonia (**Fig. 9**).

En los grupos I y III se encontraron las macrocolonias con mayor área, no obstante, las macrocolonias del grupo III mostraron más arrugas y anillos comparadas con las del grupo I. En el grupo II se agruparon las macrocolonias más pequeñas y también contienen arrugas y anillos, aunque en una menor extensión que los grupos I y II, en este grupo también se encontraron los controles negativos, indicando que las macrocolonias en este grupo tienen pocas características referentes al fenotipo, por último, el clúster IV incluye sólo una cepa que ocupan un área intermedia, pero es aquella que presenta el mayor número de crestas de todas las cepas estudiadas (**Fig. 9**). Esto muestra que la diversidad intra-genotipo no se restringe únicamente a las variaciones genómicas entre las cepas ST213, sino que a nivel de subgrupo (NA-ST213) existe diversidad que puede ser conferida por múltiples factores.

Es importante mencionar que las variaciones intra-genotipo no son exclusivas del genotipo ST213, las cepas de referencia ST19 se localizaron cada una en

diferentes grupos, por ejemplo; la cepa de referencia SL1344 es una cepa derivada de la cepa ST4/74 y difieren únicamente en 7 nucleótidos⁹²⁻⁹⁴, la primera presentó pocos rasgos del morfotipo RDAR, mientras que la segunda mostró una arquitectura bien estructurada con crestas, anillos e incremento del área (**Fig. 10**). En otro estudio se identificó que la cepa SL1344 presentaba dificultades para formar biopelículas debido a que transcribía a niveles muy bajos el gen *mlrA* involucrado en la producción de celulosa⁹⁵. Lo cual indica que la microevolución a nivel transcriptómico también debe tenerse en consideración al estudiar las variaciones de este morfotipo ya que no todas son atribuibles al contenido génico. La diversidad dentro de las cepas de referencia nos recuerda la importancia de usar enfoques más holísticos y menos reduccionistas en el estudio de los patógenos emergentes, para evitar sesgar las investigaciones en este campo de estudio.

Con la intención de entender mejor la composición de las macrocolonias, se cuantificó la fijación de rojo congo, colorante que se une selectivamente a los amiloides. Si bien no es suficiente para determinar la naturaleza de la proteína a la cual se une, algunos estudios han reportado que, en el caso de las macrocolonias del fenotipo RDAR, está principalmente asociado al curli^{96,97}. Se ha hipotetizado que el curli es uno de los elementos involucrados en la resistencia a la desecación en las biopelículas, sin embargo, también es un componente estructural importante que le confiere viscoelasticidad a las biopelículas⁹⁷.

Los resultados muestran que la dinámica de producción del curli es dependiente del tiempo; no obstante, no es homogénea para todas las cepas analizadas. Por ejemplo, la cepa 14028 produce o acumula la mayor cantidad de curli a tiempos de incubación más largos comparados con las otras cepas en su grupo (**Fig. 10A**), mientras que las cepas que se identificaron en el grupo II y presentaban menos rasgos del morfotipo, fijaron menos rojo congo en comparación con las cepas de los grupos I y III; sin embargo, de forma interesante, la cepa del grupo IV, que presentaba características estructurales asociadas al morfotipo formó gran cantidad de crestas y fijó bajas cantidades del colorante indicando que la formación de biopelícula por esta cepa puede estar vinculada con otro componente estructural como la celulosa.

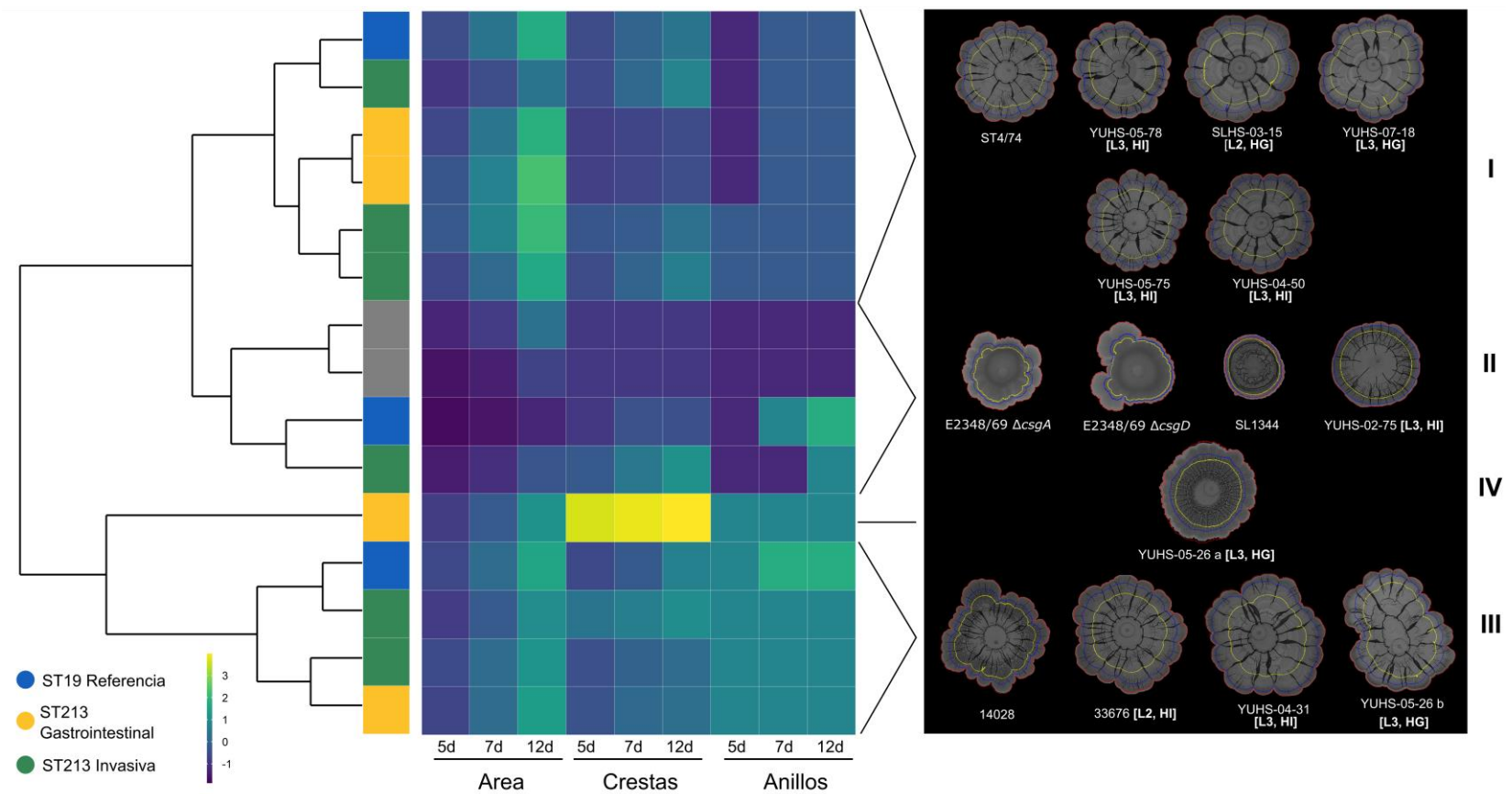


Figura 9| Análisis del desarrollo del morfotipo RDAR por cepas de *S. Typhimurium*. Del lado izquierdo se muestra el análisis de agrupación de las macrocolonias basado en las características estructurales principales del morfotipo RDAR, en color gris se indican los controles E2348/69 $\Delta csgA$ y $\Delta csgD$. Del lado derecho se observan fotografías de las macrocolonias formadas por *S. Typhimurium*, las líneas amarillas indican el contorno de crecimiento de la colonia a los 5d, en azul a los 7d y en rojo a los 12d. El análisis de agrupación jerárquica y el diagrama fueron realizados en RStudio, las imágenes del morfotipo fueron analizadas usando el software FIJI.

Lo anterior nos llevó a realizar un análisis de correlación para investigar cuál podría ser la distribución de los compuestos amiloides como el curli en la macrocolonia (**Fig. 10B**), encontrando correlación entre el área y el rojo congo pero no con el número de anillos o crestas, indicando que estos compuestos se encuentran distribuidos en la base de la colonia pero no específicamente en las regiones superiores más estructuradas. Estos resultados son parcialmente congruentes con lo reportado para *E. coli*, en donde se propone que el curli no es el principal elemento en las crestas de las macrocolonias sino la celulosa⁵⁴. Sin embargo, estudiar los microambientes generados en las diferentes capas de las macrocolonias y cómo las bacterias se adaptan a ellos es un campo de estudio interesante que merece la pena ser explorado en el contexto de la diversidad evolutiva. Además, durante los experimentos realizados en este trabajo se observó una alta homogeneidad entre las macrocolonias en cada experimento independiente (la imagen puede ser consultada en el **Anexo 6**), revelando que componentes genéticos podrían estar controlando el patrón de producción de anillos, crestas y la forma global de la macrocolonia, más allá de solo ser influidas por fenómenos físicos como la dureza del agar, la muerte celular o la disponibilidad de oxígeno⁹⁸⁻¹⁰⁰, lo cual abre perspectivas de investigación interesantes.

Considerando que, aunque la formación de las estructuras tridimensionales complejas nos da información sobre la habilidad de estas cepas para formar biopelículas, su proceso de formación es multifactorial y puede estar influido por el tipo de superficie de adhesión, el sustrato y la interfaz aire-biopelícula¹⁰¹. Por ello se decidió analizar la formación de biopelículas de estas cepas usando adicionalmente la técnica de tinción por cristal violeta, en donde la superficie de adhesión es poliestireno y el sustrato es líquido. Se usaron las mismas condiciones de temperatura y tiempos de incubación que para la evaluación del morfotipo RDAR.

Los resultados fueron consistentes con la formación del morfotipo RDAR, sin embargo, en lugar de cuatro clústeres se formaron tres, uno en donde se agrupan las cepas que presentan baja formación de biopelículas que incluye a los controles negativos y a las dos cepas con menos rasgos del morfotipo RDAR (grupo II).

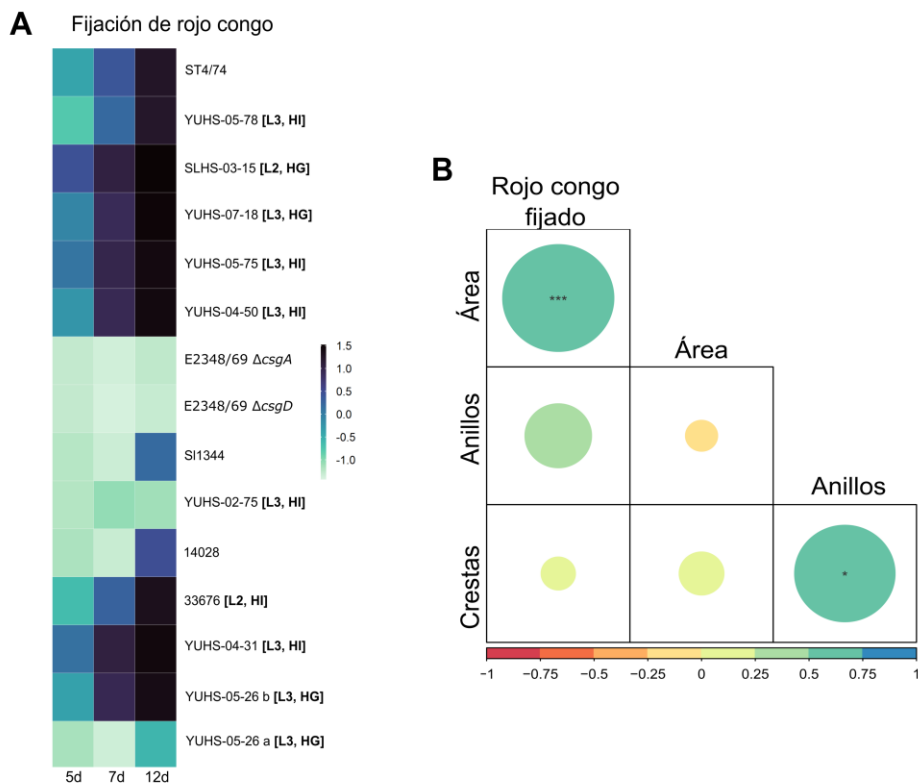


Figura 10| Fijación diferencial del colorante rojo congo por cepas de *S. Typhimurium*. A. Heatmap indicando la concentración de colorante rojo congo fijado por las macrocolonias RDAR a través del tiempo. **B.** Análisis de correlación entre las características estructurales del morfotipo RDAR y la fijación de rojo congo (** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

Enseguida se encontraron cepas con formación intermedia de biopelícula e incluyen a la mayoría de las cepas con una cantidad media de anillos y crestas pertenecientes al grupo I. Por último, se encontraron las cepas con alta formación de biopelícula, conformadas por las cepas con mayor número de anillos y que se localizaron anteriormente en el grupo III, además aquí se encontró también a la única cepa del grupo IV (**Fig. 9, Fig. 11**).

Lo cual indica que estas cepas son capaces de mantener su habilidad de formar biopelículas en condiciones variadas y esta habilidad puede verse más afectada por factores como la temperatura y la composición del sustrato, que por el tipo de superficie de adhesión o si el sustrato es líquido o sólido.

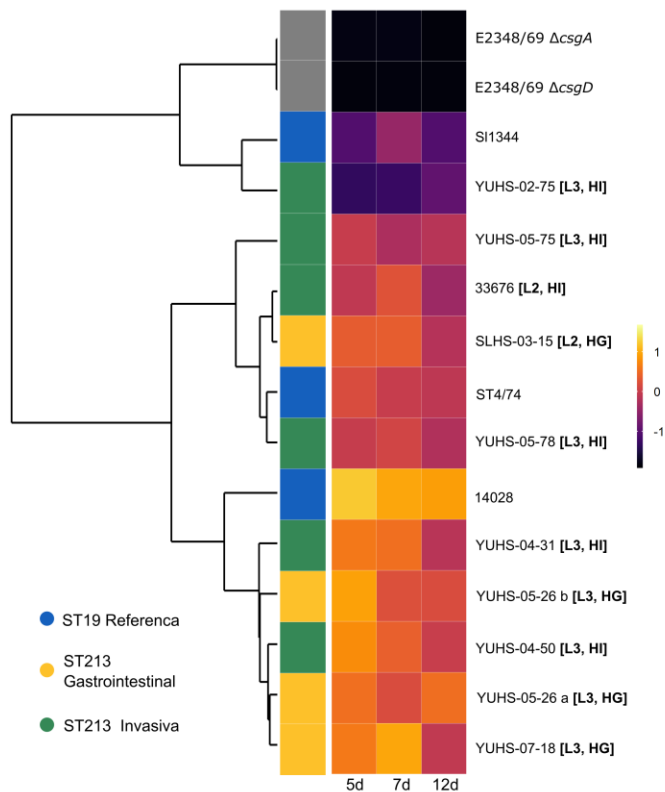


Figura 11| Análisis de agrupación de la formación de biopelículas por cepas de *S. Typhimurium*. Las cepas se evaluaron en su habilidad para formar biopelículas a 20°C en LB sin sal por 5d, 7d y 12d en placas de 96 pozos, la cantidad de biopelícula formada se cuantificó usando el ensayo de cristal violeta tal como se describe en la sección de metodología, en color gris se indican los controles E2348/69 $\Delta csgA$ y $\Delta csgD$. El análisis de agrupación fue realizado en RStudio.

Es importante mencionar que no se identificó ninguna característica singular del morfotipo ST213 en los linajes evaluados que permitiera relacionarlo con, por ejemplo, el linaje, fuente de aislamiento o genoma accesorio. Sin embargo, la habilidad de estas cepas para formar biopelículas, tanto en superficies sólidas como en medio líquido, muestra diferencias fenotípicas, lo cual indica que la diversidad de este genotipo no solo es a nivel genómico y, a su vez, sugiere que el genotipo ST213 continúa diversificando sus habilidades de supervivencia ambiental y, por lo tanto, su potencial transmisibilidad.

7.2.3 Los aislados NA-ST213 presentan baja internalización y elevada replicación en células eucariotas.

La patogénesis de *S. Typhimurium* incluye tres etapas cruciales; adhesión, internalización y replicación^{102,103}. Considerando que estas cepas carecen de determinantes de virulencia asociados a estas etapas (*pefABCD*, *rck*, *spvACD*, *mig-*

5) como se describió previamente en la **sección 7.1.2**, se decidió profundizar en el estudio de la patogénesis de las cepas NA-ST213 usando líneas celulares biológicamente relevantes; macrófagos humanos (U-937 y THP-1), enterocitos humanos (C2BBE1 y HT-29) y fibroblastos murinos (MEFs 3T3). Estas líneas celulares fueron infectadas con cuatro aislados ST213 provenientes de infecciones gastrointestinales o invasivas, dos pertenecientes al linaje 2, 33676 (invasiva) y SLHS-03-15 (gastrointestinal), y dos al linaje 3, YUHS-05-78 (invasiva) y YUHS-07-18 (gastrointestinal), así como con la cepa prototipo ST19 SL1344 para propósitos comparativos.

Todos los aislados mostraron bajos niveles de adhesión a líneas celulares humanas en comparación con la cepa ST19 (**Fig. 12**), excepto por los dos aislados de infección gastrointestinal que presentaron mayor adhesión a macrófagos THP-1 (**Fig. 12B**). En contraste, la adhesión de los aislados NA-ST213 a fibroblastos murinos fue mayor o igual a la adhesión de la cepa ST19 (**Fig. 12E**).

Además, se exploró de forma general el papel de uno de los reguladores centrales de la patogénesis de *S. Typhimurium*; HilD, el cual ha sido ampliamente estudiado en las cepas prototipo, este regulador no tiene una función definida en la adhesión, aunque si en el proceso de internalización, sin embargo, dada la diversidad de las cepas NA-ST213 se estudió si tenía un papel en estas cepas durante la adhesión, por lo cual mutantes en el regulador HilD ($\Delta hilD$) de las cepas ST213 y ST19 fueron evaluadas en su habilidad para adherirse a las líneas celulares. De forma interesante todas las cepas mutantes, incluyendo a la cepa de referencia (mutante y silvestre) presentaron una disminución en la adhesión a macrófagos U-937 comparadas con sus cepas parentales (**Fig. 12A**). En células epiteliales solo se observó disminución en la adhesión por parte de las mutantes NA-ST213 en fibroblastos 3T3 (**Fig. 12E**). La cepa SLHS-03-15 $\Delta hilD$, además de adherirse menos a las líneas antes mencionadas, también se adhirió menos a las células THP-1 y HT-29 (**Fig. 12B, Fig. 12D**), por lo cual HilD puede estar jugando un papel diferente en las cepas NA-ST213 y de forma más particular en la cepa SLHS-03-15, lo cual da indicios de que la evolución de estas cepas puede haber

llevado a rearrreglos en algunas redes de regulación transcripcional, o la presencia o ausencia de genes involucrados en este fenotipo.

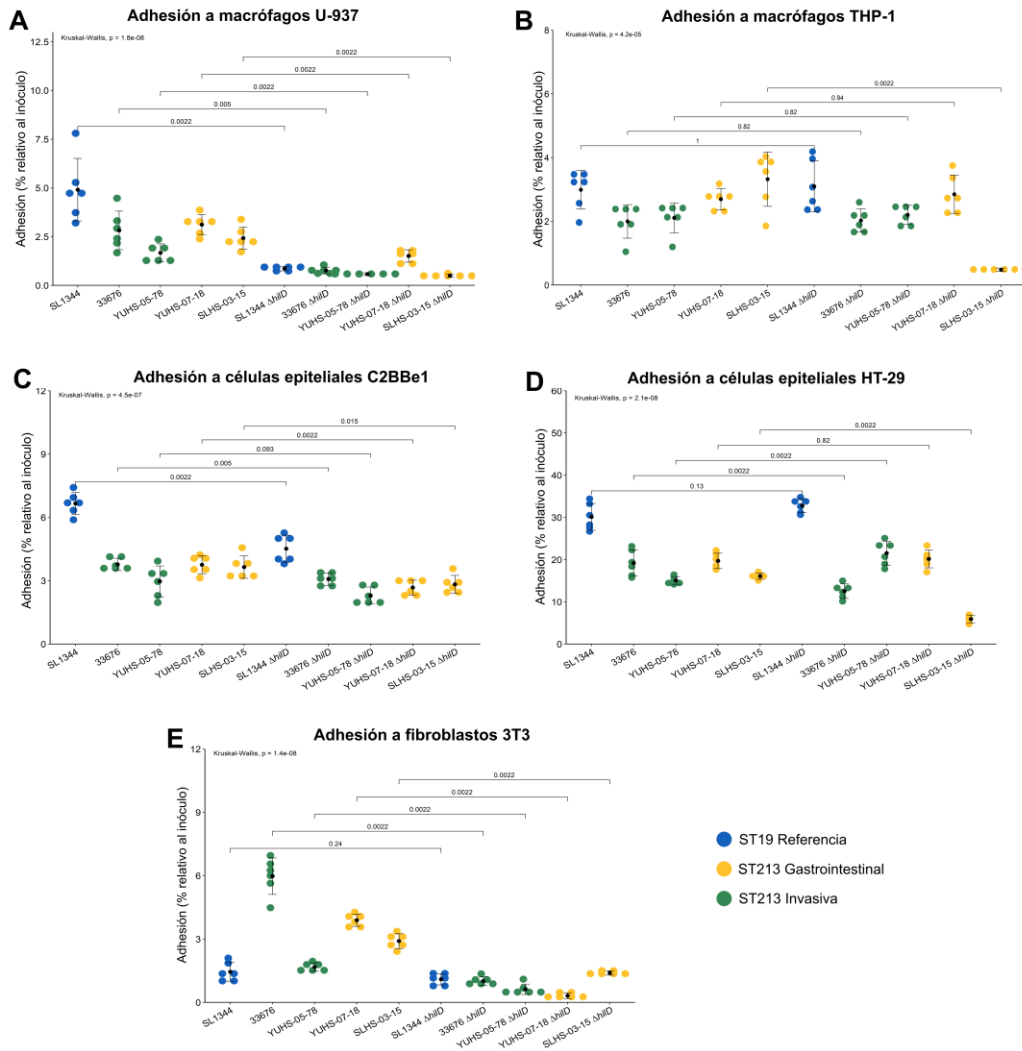


Figura 12| Adhesión de cepas de *S. Typhimurium* a células eucariotas. Macrófagos **A.** U-937 **B.** THP-1. Enterocitos **C.** C2BBE1, **D.** HT29 y fibroblastos **E.** 3T3, se inmovilizaron con citocalasina D por 1h, enseguida fueron infectados con las cepas de *S. Typhimurium* y se permitió su adhesión a las monocapas por 30min. Transcurrido el tiempo las monocapas se lavaron y lisaron, las bacterias adheridas fueron enumeradas contando unidades formadoras de colonias. Los grupos fueron comparados usando la prueba de Wilcoxon y los *P*-values se indican en la gráfica.

En conjunto los resultados revelan que las interacciones de *S. Typhimurium* con células en cultivo son dependientes de la línea celular, indicando posibles tropismos en relación con el hospedero o nichos dentro del hospedero. No menos importante, también reflejan la importancia de elegir correctamente el modelo de

estudio a utilizar o considerar usar más de una línea celular que permita realizar estudios comparativos más informativos que, a la vez, faciliten contrastar la literatura existente donde el modelo celular utilizado es muy variable.

La internalización de las cepas NA-ST213 fue escasa en todas las líneas celulares epiteliales y en los macrófagos THP-1 en comparación con la cepa prototipo (**Fig. 13B-E**). En el caso de los macrófagos U-937 (**Fig. 13A**), en el caso de los macrófagos U-937 las cepas NA-ST213 se internalizaron a los mismos niveles que la cepa prototipo (**Fig. 13A**), que puede deberse a la exacerbada fagocitosis que ha sido reportada para esta línea celular^{104,105}, haciendo insignificante la contribución de la macropinocitosis inducida por el patógeno.

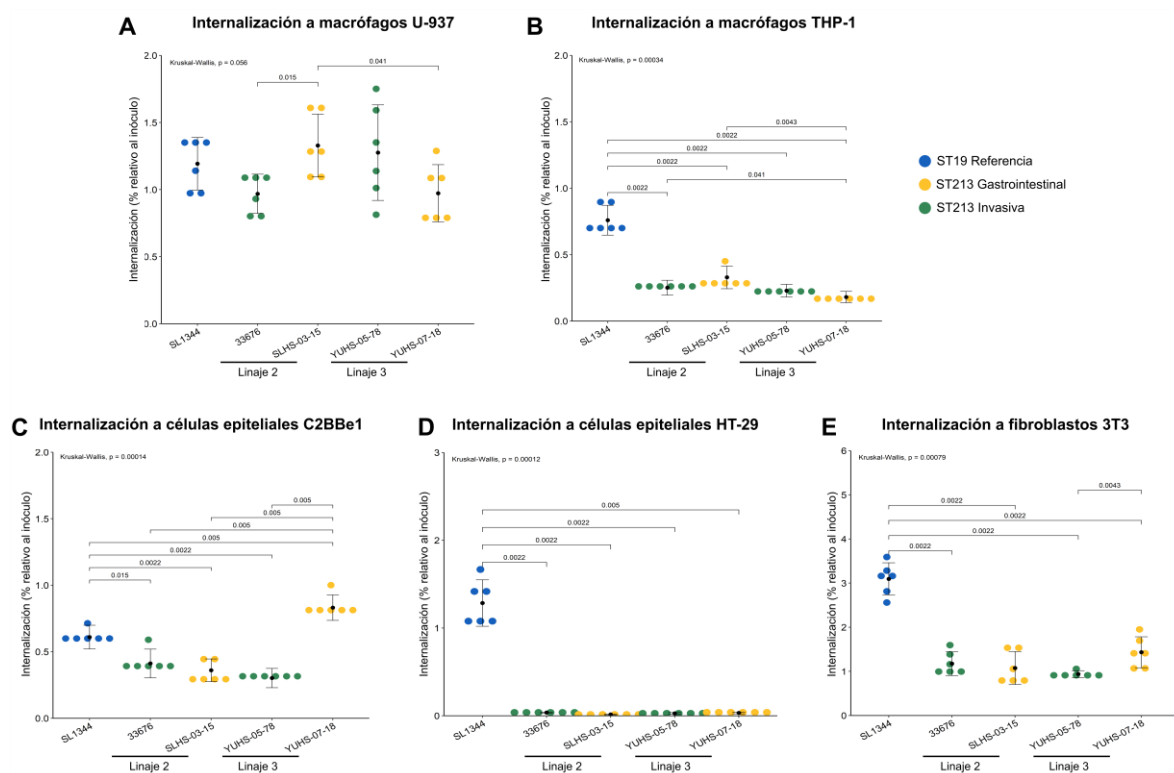


Figura 13| Internalización de cepas de *S. Typhimurium* a células eucariotas. Macrófagos **A.** U-937 **B.** THP-1. Enterocitos **C.** C2BBE1, **D.** HT29 y fibroblastos **E.** 3T3. Fueron infectados con *S. Typhimurium*, la internalización se midió usando ensayos de protección a los aminoglucósidos, las células se incubaron 2h, enseguida las monocapas se lavaron y lisaron, las bacterias intracelulares viables fueron enumeradas contando unidades formadoras de colonias. Los grupos fueron comparados usando la prueba de Wilcoxon, los *P*-values se indican en la gráfica.

Además, se evaluaron las cepas mutantes en *HilD* para indagar su papel en la internalización y no se identificaron diferencias con respecto a lo reportado previamente para la cepa prototipo (**Tablas complementarias 1-5**). Es importante mencionar que los aislados estudiados no tienen problemas de motilidad ni de secreción de los efectores relevantes para la invasión (**Fig. 14A-B**) y por ello la disminución en la internalización no es atribuible a un factor de fácil identificación.

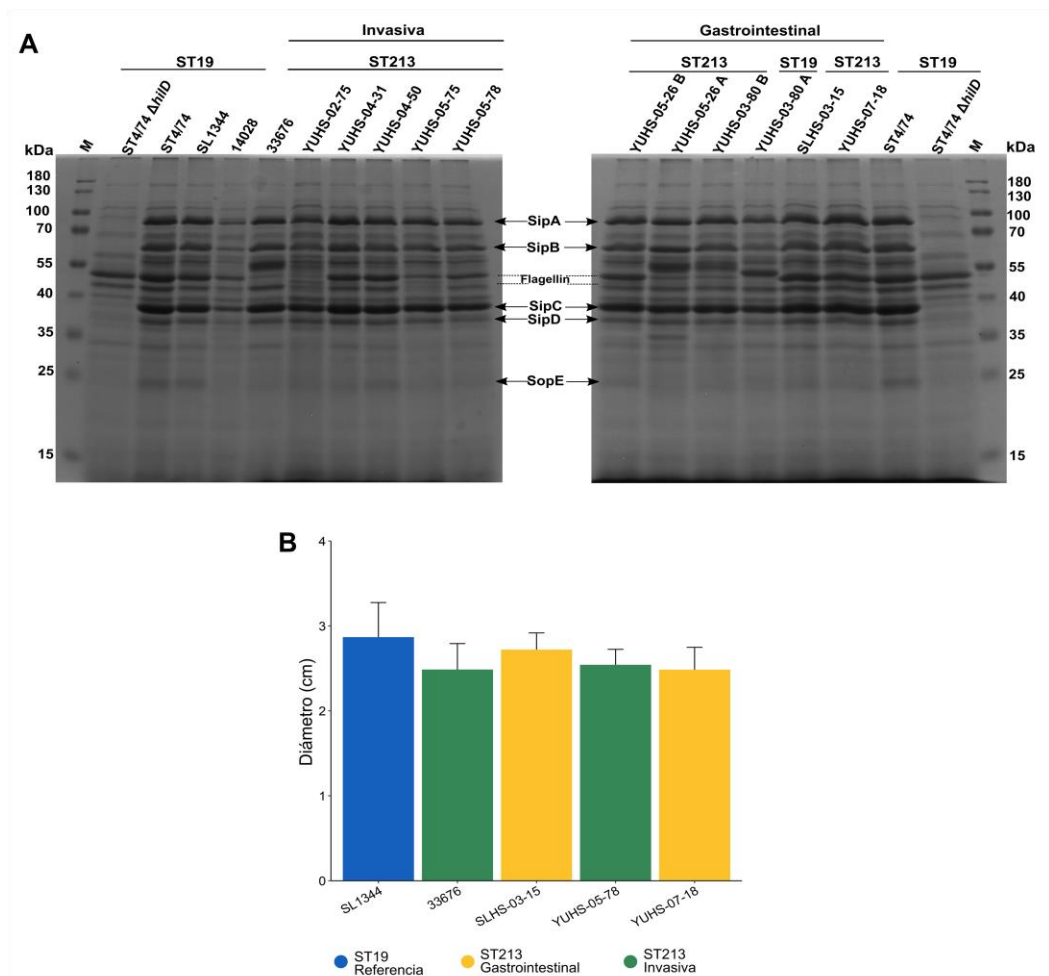


Figura 14| Perfiles de proteínas secretadas y motilidad de las cepas NA-ST213. A. Se muestran los perfiles de proteínas secretadas de las cepas ST19 y NA-ST213. Se incluye como control negativo la cepa ST4/74 Δ *hilD*. **B.** Diámetro de migración de las cepas ST19 y NA-ST213 en LB agar suave (0.3% Bacto agar), el diámetro fue medido usando FIJI software.

Sorprendentemente, las tasas de replicación de los aislados NA-ST213 fueron iguales o superiores a las de la cepa de referencia (**Fig. 15A-E**). En aquellas células donde la internalización estuvo menos comprometida, C2BBe1 y THP-1, las cepas NA-ST213 alcanzaron las mismas cargas bacterianas que la cepa prototipo, mientras que en fibroblastos y células HT-29 alcanzaron la mitad de la carga bacteriana de la cepa ST19 (**Anexo 7**). Considerando que la internalización en células HT-29 fue siete veces menor que la de la cepa ST19, la replicación compensa exitosamente esta disminución en la invasión. Las altas tasas de replicación no afectaron la viabilidad celular, ni tampoco las tasas bajas de internalización mostraron menor citotoxicidad en las etapas tempranas de la infección en comparación con la cepa de referencia (**Anexo 8**).

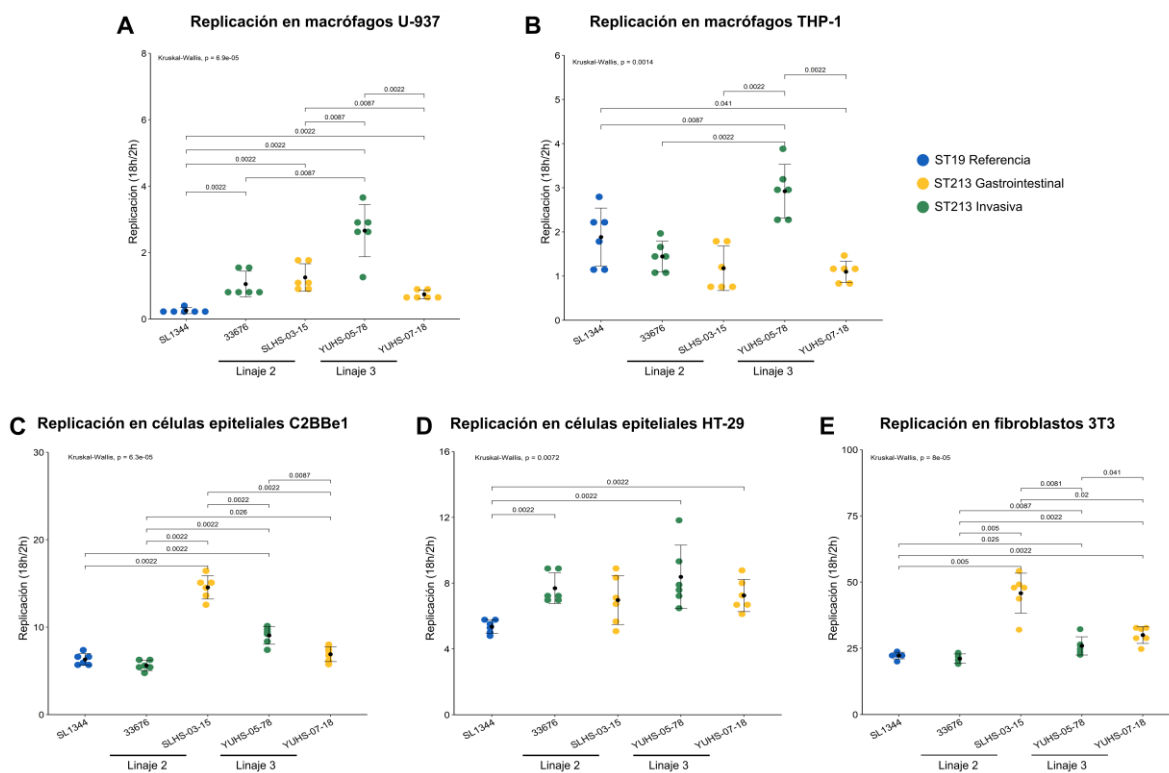


Figura 15| Replicación de cepas de *S. Typhimurium* en células eucariotas. Macrófagos **A.** U-937 **B.** THP-1. Enterocitos **C.** C2BBe1, **D.** HT29 y fibroblastos **E.** 3T3. Fueron infectados con *S. Typhimurium* y la replicación se midió usando ensayos de protección a los aminoglucósidos, las células se incubaron 18h, enseguida las monocapas se lavaron y lisaron, las bacterias intracelulares viables fueron enumeradas contando unidades formadoras de colonias. Los grupos fueron comparados usando la prueba de Wilcoxon, los *P*-valores se indican en la gráfica.

Con los resultados anteriores surgió la pregunta de si este comportamiento era particular a la submuestra de cepas NA-ST213 estudiadas. Por lo tanto, para ver si este fenotipo era extensivo a otros aislados NA-ST213 se evaluaron seis cepas más, cuatro provenientes de infecciones invasivas y dos de infecciones gastrointestinales, de las cuales cinco presentaron el mismo fenotipo que las otras cepas estudiadas (**Fig. 16A-B**) encontrando solo una cepa con invasión y replicación similar a la cepa de referencia.

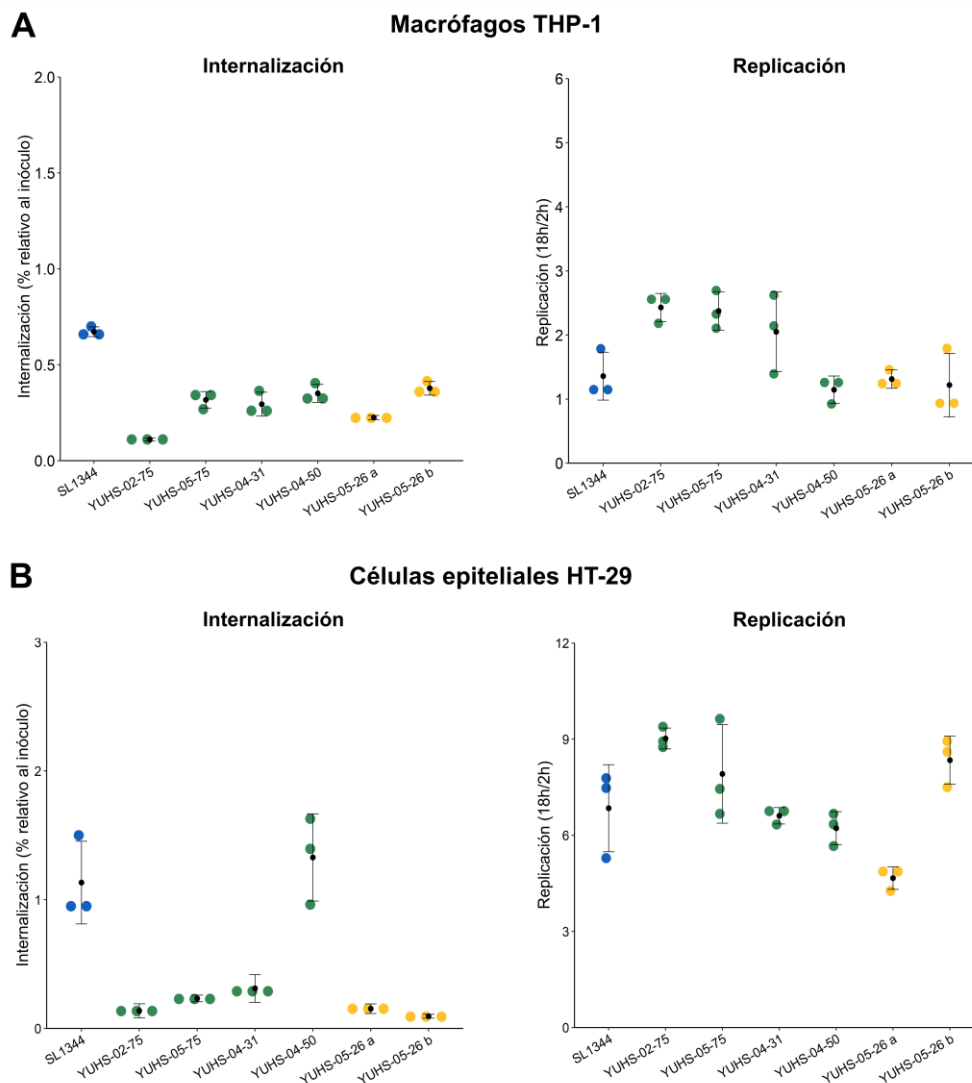


Figura 16| Internalización y replicación de cepas de *S. Typhimurium* en células eucariotas. Macrófagos THP-1 (A), enterocitos HT29 (B). Fueron infectados con las cepas de *S. Typhimurium*, indicadas en la gráfica. La internalización y replicación se midieron usando ensayos de protección a los aminoglucósidos, las células se incubaron 2h (internalización) o 18h (replicación), enseguida las monocapas se lavaron y lisaron, las bacterias intracelulares viables fueron enumeradas contando unidades formadoras de colonias. Los grupos fueron comparados usando la prueba de Wilcoxon, los *P*-values se indican en la gráfica.

Al evaluar este fenotipo se observaron sutiles diferencias entre las cepas NA-ST213; sin embargo, ninguna de estas diferencias permite establecer una correlación entre los linajes o el tipo de infección. No obstante, los aislados sí presentan características comunes que pueden ser una marca del genotipo, tales como bajas tasas de internalización en células humanas y la compensación de esta deficiencia con altas tasas de replicación, sin afectar la viabilidad celular. Esta observación es crucial para entender la patogénesis de este nuevo genotipo que comienza a expandirse por Norteamérica, para implementar medidas que mejoren su monitoreo y control.

7.2.4 Dos cepas NA-ST213 no expresan completa la proteína de membrana externa OmpD.

Dos de las cepas incluidas en este estudio presentaban una característica singular, a nivel genómico, contenían interrupciones en el gen que codifica para la proteína de membrana externa OmpD. La cepa YUHS-05-78, aislada en 2005, presentó una interrupción en el gen debido a la inserción de una transposasa hipotética y la cepa YUHS-07-18 aislada en 2007 tiene un codón de paro a un tercio del inicio de transcripción del gen (**Fig. 17A**). La ausencia de la proteína se verificó a través de perfiles de membrana externa (**Fig. 17B**), así se confirmó que OmpD era la única proteína de las más abundantes (OmpA, OmpC, OmpF) que no se expresa. Sin embargo, no es posible descartar que haya producción del péptido señal de la proteína OmpD, ya que no se realizó western para su identificación, no obstante, la producción de este fragmento no permitiría la formación de la estructura de OmpD.

La proteína OmpD no tiene un rol claro en la patogénesis bacteriana; sin embargo, ha sido propuesta como un candidato vacunal importante en el desarrollo de vacunas contra *Salmonella* no tifoideas (SNTs), debido a que *S. Typhi* no posee esta proteína no se ha logrado una inmunización cruzada exitosa. En este aspecto es en donde se vuelve relevante que algunas cepas no presenten esta proteína ya que, si se desarrollan vacunas usando OmpD como elemento principal contra *S. Typhimurium*, puede llevar a una selección de subpoblaciones que no poseen la proteína y por ende disminuir la eficiencia de la vacuna contra las infecciones por este patógeno^{106,107}.

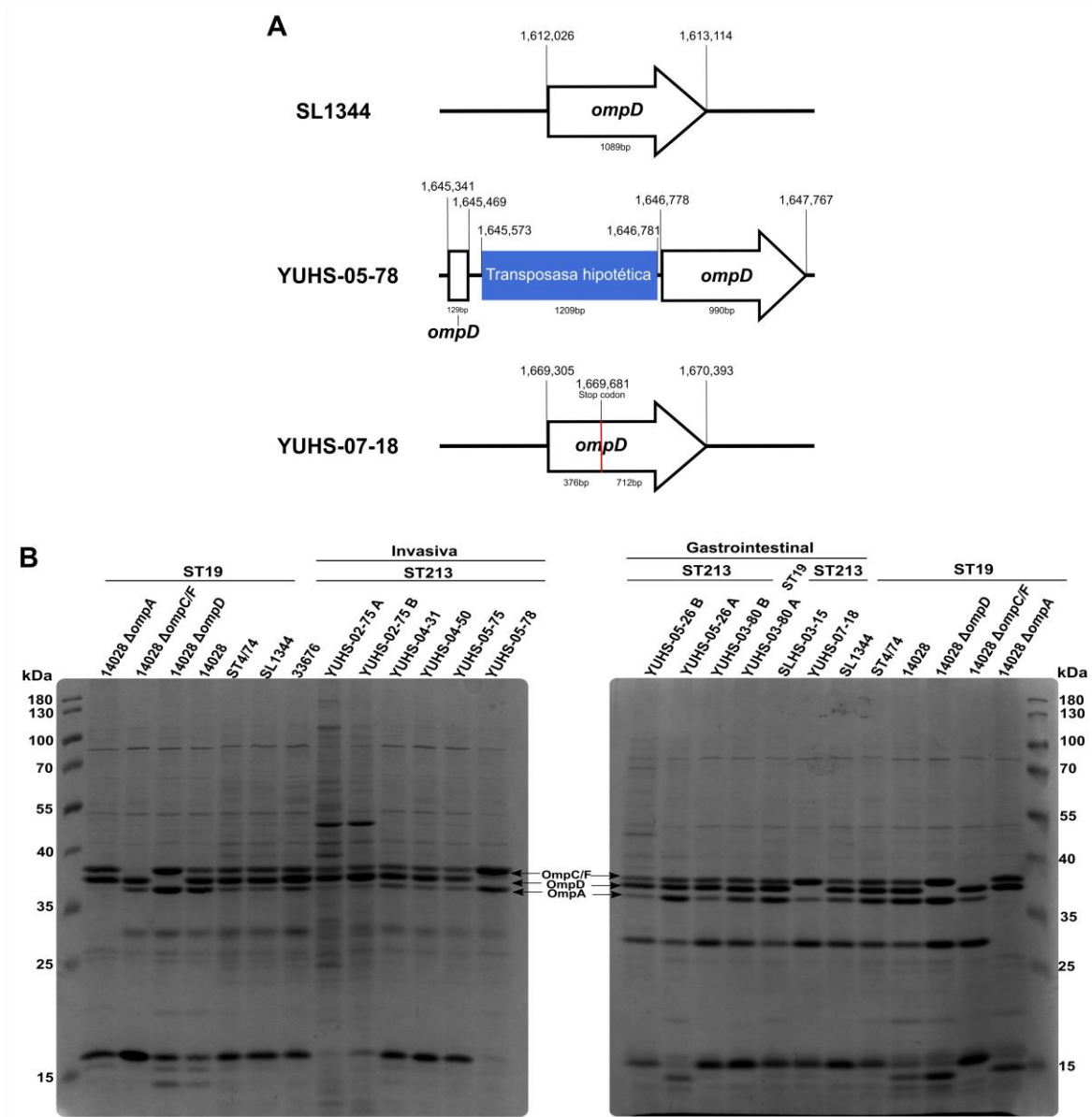


Figura 17 | Dos cepas NA-ST213 contienen interrupciones en el gen que codifica para la proteína de membrana externa *OmpD*. **A**. Representación esquemática de las interrupciones genómicas identificadas en las cepas ST213, en comparación con la cepa de referencia SL1344, las coordenadas de los genomas se indican en la parte superior de las flechas, mientras que en la parte inferior se indica el tamaño de la región génica. **B**. Perfiles de proteínas de membrana externa de diferentes cepas NA-ST213, incluyendo las cepas con interrupciones, se incluyen como controles la cepa de referencia 14028 y sus mutantes en *ompA*, *ompC/F* y *ompD*.

7.3 Avances de casos de estudio específicos de las cepas NA-ST213.

7.3.1 Estudio de una población mixta de *S. Typhimurium* formada por una cepa ST19 y una ST213.

Las infecciones mixtas o las mezclas de aislados durante el muestreo no son inusuales en la práctica clínica, por lo tanto, algunos aislados no son cultivos puros, en casos en donde se encuentran dos o más serovares mezclados es más fácil realizar una purificación de cultivos; sin embargo, cuando se trata del mismo serovar la purificación es más compleja. En la realización de este trabajo se pudieron identificar dos aislamientos que estaban conformados por dos cepas que presentaron variaciones fenotípicas, la cepa YUHS-05-26 conformada por dos aislados ST213, pero diferían significativamente en la formación del morfotipo RDAR, debido a la dificultad para discernir si se trata de dos cepas diferentes o de una variación estocástica de la población, se consideró la segunda opción, hasta que se cuenten con genomas individuales para diferenciarlas. Mientras que el otro grupo de aislados, la cepa YUHS-03.80 estaba constituida por una cepa resistente a gentamicina y una sensible. Para verificar el genotipo, se realizó la amplificación por PCR y secuenciación de los 7 genes usados para la clasificación por MLST, de tal manera que se pudo identificar que la cepa resistente a gentamicina es genotipo ST19 (YUHS-03-80 a) y la sensible ST213 (YUHS-03-80 b).

Se verificaron sus proporciones y se identificó que se encuentran aproximadamente 1:1 en la mezcla original del aislamiento (**Fig. 18A**). Se analizaron diferentes fenotipos para ver el comportamiento de cada aislado de forma individual; ambos aislados son capaces de formar el morfotipo RDAR, sin embargo, sus arquitecturas son marcadamente distintivas, la cepa ST19 mostró menos área y más crestas en comparación con la cepa ST213, lo cual también llevó a variaciones en la fijación de rojo congo, donde la cepa ST19 con más crestas fijo un tercio menos del colorante que la cepa ST213, indicando que la macrocolonia formada puede contener menor cantidad de amiloides (**Fig. 18B**). Con base en esto sus niveles de formación de biopelícula en medio líquido es congruente con lo observado anteriormente para las macrocolonias, siendo la cepa ST213 la que formó mayor cantidad (**Fig. 18C**). También se evaluó la motilidad de estas cepas, y la cepa ST19

formó halos de desplazamiento más amplios que la cepa ST213 a las 5h de crecimiento (Fig. 18D).

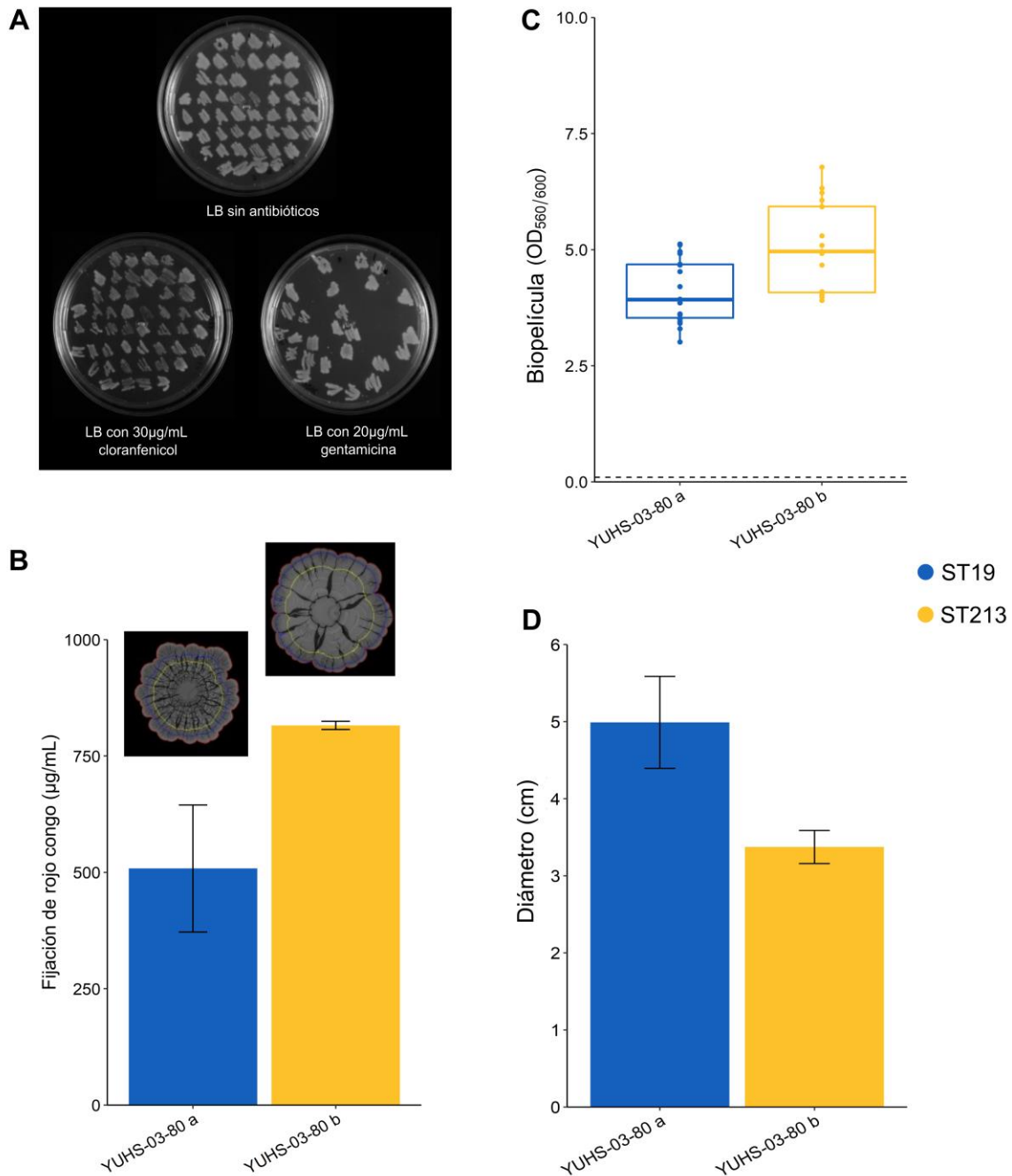


Figura 18| Comparación fenotípica de las cepas YUHS-03-80 a y b. A. Separación de las colonias de las cepas mezcladas usando placas de LB con 20µg/mL de gentamicina. **B.** Formación individual del morfotipo RDAR y fijación de rojo congo de las cepas ST19 y ST213. **C.** Formación de biopelícula en microplacas de las cepas analizadas. **D.** Ensayos de motilidad en agar suave.

Se evaluó la patogénesis de estas cepas, estudiando su internalización y replicación en cuatro líneas celulares, dos líneas de macrófagos (U-937 y THP-1) y dos líneas de células epiteliales (HT-29 y fibroblastos 3T3). En los macrófagos U-937 la cepa ST19 mostró mayor internalización comparada con la cepa ST213, pero, presentaron niveles similares de internalización en células THP-1. Mientras que para las células epiteliales al igual que las otras cepas NA-ST213, esta cepa ST213 mostró baja internalización en ambas, sorprendentemente la cepa ST19 también mostró baja internalización en fibroblastos 3T3 a diferencia de la cepa ST19 de referencia analizada en la sección anterior (**Fig. 19A**). La replicación de la cepa ST19 fue deficiente en todas las líneas celulares analizadas, mientras que la cepa ST213 mostró niveles de replicación similares a las otras cepas ST213 previamente evaluadas (**Fig. 19B**).

Debido a que estas cepas pudieron haberse aislado del mismo paciente, se exploró si mezcladas en ensayos de invasión y replicación presentaban un comportamiento cooperativo, para ello se realizaron ensayos de competencia en fibroblastos 3T3 y células HT29. Para la internalización no se observó labor cooperativa entre estas cepas, ya que la cepa ST213 que presenta dificultad para invadir células HT29 continuó estando por debajo de la cepa ST19 (**Fig. 19C**). Los índices competitivos para la replicación tampoco muestran cooperatividad durante esta etapa, la cepa ST19 continuó internalizándose a los mismos niveles que de forma individual (**Fig. 19C**).

Estos resultados pueden llevar a plantear la hipótesis de que estas cepas pudieron haberse mezclado en el proceso de aislamiento o que si fueron adquiridas por un mismo paciente ocurrió en eventos distintos. No obstante, tampoco se puede descartar que la ventaja en la coexistencia de estos aislados ocurra a nivel ambiental ya que las características de sus biopelículas son distintas, por lo tanto, explorar la cooperatividad de estos aislados durante la formación de biopelículas podría ayudar a entender mejor estas interacciones entre subpoblaciones. Además, los problemas de replicación de la cepa ST19 resaltan la diversidad que existe dentro del genotipo fundador y que ha sido descuidada debido a que las investigaciones se han enfocado en pocos aislados.

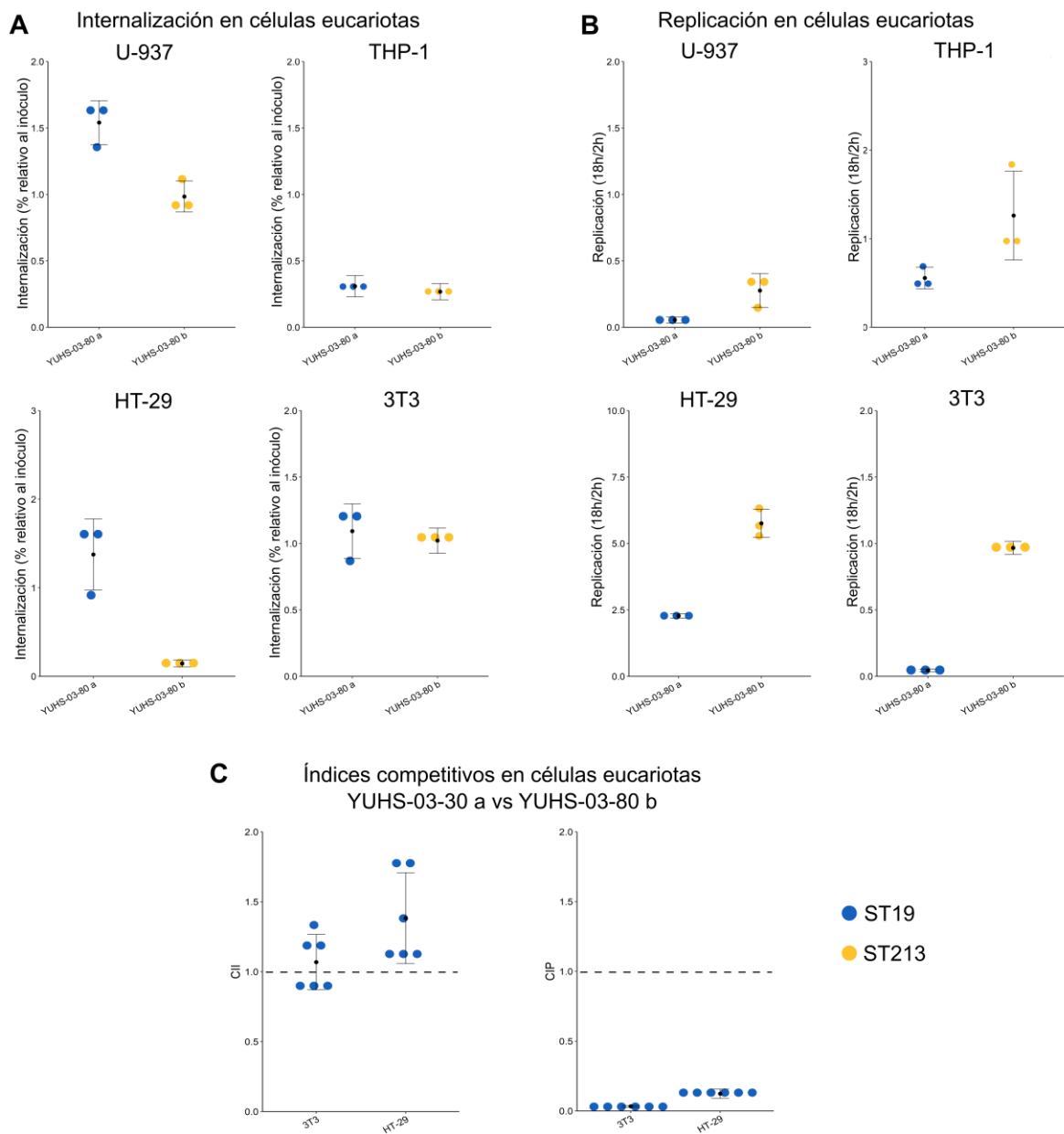


Figura 19| Exploración de la patogénesis de las cepas YUHS-03-80 a y b. A. Internalización de las cepas YUHS-03-80 a y b a macrófagos (U-937 y THP-1), enterocitos (HT-29) y fibroblastos 3T3. **B.** Replicación de las cepas YUHS-03-80 a y b en macrófagos (U-937 y THP-1), enterocitos (HT-29) y fibroblastos 3T3. **C.** Índices competitivos en invasión y replicación (izquierda y derecha respectivamente), usando marcadores de resistencia a antibióticos para distinguir a las cepas.

7.3.2 Motilidad y competencia por espacio

Las bacterias coexisten en diferentes contextos y esto puede llevarlas a competir por nutrientes o nichos, sin embargo, los mecanismos que detonan la competencia espacial no se han dilucidado¹⁰⁸. En este trabajo se observó un fenómeno de exclusión entre bacterias durante el nado. Este comportamiento se da entre cepas tanto del mismo como diferente genotipo, por lo tanto, no es específico de un grupo particular de aislados. No obstante, esta exclusión no ocurre entre cepas que son derivadas la una de la otra (SL1344 y ST474) indicando que el mecanismo puede ser una forma de reconocimiento aún no estudiada en *S. Typhimurium* (**Fig. 20**).

Esto puede deberse a un mecanismo de competencia espacial, en el cual las bacterias que nadan más rápido ocupan el espacio y por lo tanto las otras bacterias al detectar la disminución del flujo de nutrientes disminuyen su crecimiento y velocidad durante la motilidad¹⁰⁸, sin embargo, existen otras alternativas como la posible secreción de sustancias inhibitoras o procesos aún más complejos como la detección específica de bacterias hermanas, como se ha reportado para *P. mirabilis*, que posee moléculas identificadoras secretadas durante el *swarming* que permiten el reconocimiento y la formación de límites con aquellas que son distintas¹⁰⁹. En este caso debido a la formación de un límite claro (**Fig. 20**), podría comenzarse a explorar la segunda opción, realizando análisis genómicos en busca de moléculas de identidad particulares usando como base el conocimiento generado para *P. mirabilis*.

Estos datos abren nuevas posibilidades al análisis de las interacciones ecológicas entre aislados diversos, que en conjunto con la sección anterior pueden arrojar luz sobre como ocurren los mecanismos cooperativos y en que contextos son más relevantes.

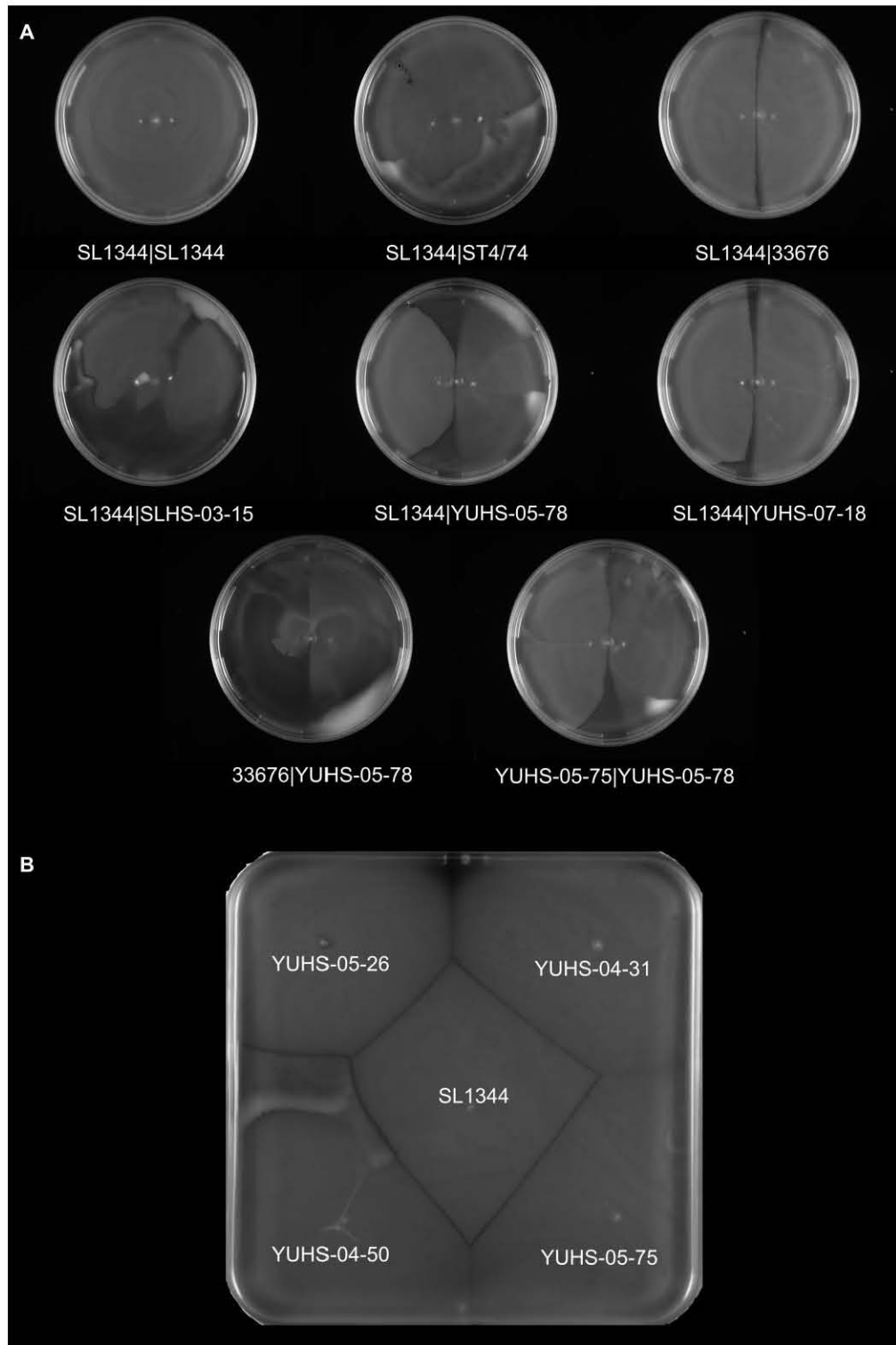


Figura 20| Exclusión durante ensayos de motilidad de las cepas de *S. Typhimurium*. A. Los ensayos de motilidad se realizaron en LB agar suave (0.3% Bacto agar), se inocularon por punción dos cepas por cada placa de agar y se incubaron por 24h a 37°C, posteriormente se fotografiaron. **B.** Cepas invasivas durante el nado muestran exclusión entre ellas y con la cepa de referencia SL1344 (ST19).

8 Conclusiones y discusión

Las salmonelas no tifoideas son un importante agente causal de infecciones invasivas y gastrointestinales alrededor del mundo¹¹⁰. El genotipo ST213 de *S. Typhimurium* se encuentra mayoritariamente distribuido en los tres países más grandes de Norteamérica (México, USA y Canadá) y el noreste de Europa (Bélgica, Francia, Portugal, Holanda, UK), este genotipo ha sido asociado con infecciones gastrointestinales y con algunas infecciones invasivas^{26,28}, es inusual que el serovar *Typhimurium* cause infecciones invasivas fuera de regiones como África subsahariana¹¹¹. Además, este genotipo continúa aislándose de un amplio rango de hospederos como animales, alimentos y agua, estando presente a lo largo de la cadena alimenticia con una extensa red de transmisión^{24,27,112,113}. En este trabajo describimos y analizamos la estructura poblacional del genotipo ST213, pudimos identificar la co-circulación de varios linajes en Norteamérica y asociando el contenido del genoma accesorio con los análisis filogenéticos pudimos identificar claramente una separación geográfica entre las cepas aislados de Norteamérica (NA-ST213) y Europa (EU-ST213).

No encontramos características específicas del genoma accesorio que vincularan a las cepas NA-ST213 y EU-ST213. Las cepas EU-ST213 fueron más cercanas a las cepas de referencia pertenecientes al genotipo fundador ST19, mientras que las cepas NA-ST213 distaban más de ellas y fueron filogenéticamente más cercanas a las cepas ST34 con las cuales comparten rasgos específicos como dos espaciadores únicos en el locus CRISPR (HadB20 y STMB34), dos pseudogenes (*casA* y *cas3'*, **Anexo 9**) y la ausencia del plásmido de virulencia pSTV. Sin embargo, las cepas NA-ST213 particularmente carecían del bacteriófago *Gifsy-1* el cual no se puede determinar si nunca fue adquirido o se perdió durante la evolución de estas cepas (**Anexo 10**), además, estos aislados contenían plásmidos de la familia IncC, es importante mencionar que no identificamos ningún ancestro común con este genoma accesorio característico entre las cepas EU-ST213, lo cual sugiere que la adquisición de estos elementos fue independiente, posiblemente debido al entorno ambiental y a las presiones selectivas en sus reservorios y hospederos.

La adquisición de material accesorio, específicamente la adquisición de los plásmidos de la familia IncC moldeó parte de la historia evolutiva de las cepas NA-ST213, el análisis espaciotemporal realizado en este trabajo indica que los linajes 2 y 3 de las cepas NA-ST213 pudieron haber adquirido este plásmido en México, el cual pudo conferirles ventajas para su transmisión debido posiblemente al contenido de genes de resistencia a antibióticos codificados en el plásmido y por ende conllevó a una mayor expansión de estos linajes comparados con el linaje 1. Sin embargo, las cepas del linaje 1 que no contienen ni el plásmido pSTV o los IncC han aparecido con el bacteriófago *Gifsy-2*, el cual estaba ausente en los aislados más antiguos de este linaje. Lo cual muestra la plasticidad que confiere el genoma accesorio a los patógenos emergentes durante su proceso adaptativo. La asociación entre la adquisición de genes de resistencia a antimicrobianos y el incremento en la transmisión se ha reportado previamente en otras *Salmonellae*, lo cual ha llevado al reemplazo de los linajes susceptibles^{111,114}. Además, reportes previos han indicado que los plásmidos IncC que contienen las cepas ST213 tiene baja frecuencia de conjugación y por lo tanto se han asociado con la expansión clonal de este genotipo²⁶, lo cual concuerda con los datos de la estructura poblacional aquí planteada y sustenta la hipótesis de la expansión de los linajes con plásmidos IncC en Norteamérica, resaltando la importancia de estudiar a los patógenos en el contexto de su estructura poblacional y región geográfica específica.

El contenido del genoma accesorio no está limitado a los plásmidos IncC, otros plásmidos han sido considerados de interés, por ejemplo; la subpoblación mexicana de las cepas NA-ST213 ha sido asociada con el fago-plásmido D6-like⁷³, nuestros análisis mostraron que este plásmido también se encuentra en las cepas de USA y Canadá, aunque en menor proporción. Sin embargo, incluso si este plásmido tuviese un papel importante en el contexto del genotipo ST213 no está ampliamente distribuido, únicamente 25% de los aislados analizados lo poseen y estuvo mayoritariamente distribuido entre los linajes 2 (39%) y 3 (76%) y ausente en el linaje 4, el cual es el más reciente. Además, en este trabajo se analizaron diferentes características fenotípicas de por lo menos cuatro aislados, dos de los cuales

contenían el plásmido D6-like y dos que no lo contenían, y no se identificaron características particulares en los fenotipos analizados.

La habilidad de estas cepas para sobrevivir a condiciones adversa fue evaluada en este trabajo como una forma indirecta de explorar su potencial de transmisibilidad en el ambiente^{6,115}. La mayoría de los aislados NA-ST213 evaluados mostraron las características del morfotipo RDAR y alta fijación del colorante rojo congo. No obstante, encontramos sutiles diferencias entre las colonias de las cepas NA-ST213, no solo a nivel estructural, sino también en el patrón temporal de fijación de rojo congo, lo cual, puede deberse a que diferentes mecanismos mejoran la producción de elementos como el curli y por ende esto modifica la fijación del rojo congo en determinadas cepas, lo cual ya ha sido reportado para *E. coli* O157:H7¹¹⁶, por lo tanto, más trabajo es necesario para entender la diversidad del morfotipo RDAR en este genotipo. En general estas cepas mostraron fuerte formación de biopelículas en diferentes condiciones, sugiriendo que pueden beneficiarse de este mecanismo de supervivencia fuera del hospedero para asegurar suficiente carga bacteriana y causar infección. En cuanto a los aislados que fijaron bajas concentraciones de rojo congo y mostraban la arquitectura del morfotipo RDAR (YUHS-02-75, YUHS-05-26 a y YUHS-03-80 a) es posible que la biopelícula formada esté sustentada por otros componentes mayoritarios como la celulosa⁵⁴, esto puede representar una ventaja adaptativa para estos aislados en el proceso de infección debido a que el sistema inmune puede reconocer a los amiloides como patrones moleculares asociado a patógenos y así eliminarlos rápidamente del hospedero¹¹⁷. Sin embargo, este rasgo es altamente variable, como ha sido reportado para otros genotipos de *S. Typhimurium* como el ST313¹⁹.

Un aspecto muy importante de las cepas ST213 es su capacidad para causar infecciones invasivas en humanos, a pesar de no contar con algunos factores de virulencia codificados en el pSTV. Este no es el único genotipo que no cuenta con este plásmido asociado a la virulencia, se ha reportado el genotipo ST34, aunque este genotipo causa principalmente infecciones gastrointestinales en humanos y animales^{15,75,118}. Nuestros resultados muestran que la falta de los elementos de virulencia del pSTV no reducen la capacidad de las cepas NA-ST213 de causar

infección, esto en conjunto con la información epidemiológica disponible del genotipo ST34 indican que el pSTV no tiene tanta relevancia en el proceso patogénico de *S. Typhimurium*, al menos para estas cepas. Las cepas NA-ST213 mostraron baja capacidad de adhesión e internalización, pero alta replicación en células eucariotas, estos datos son similares a los reportados para las cepas ST313 en Brasil¹¹⁹, los aislados ST34 (alta replicación)⁷⁸, y el serovar *S. Typhi* (baja adhesión e internalización) restringido a humanos¹²⁰. No obstante, otros estudios con cepas ST213 aisladas de alimentos han mostrado que pueden internalizarse a altas tasas en células epiteliales no diferenciadas²⁷, esto puede deberse a múltiples factores por un lado puede estar relacionado al tipo de línea celular y condiciones de cultivo e infección usadas para evaluar la internalización, por otro la fuente de aislamiento. Además, debido a la ausencia de genomas secuenciados de esas cepas, nos es desconocido cuál es su posición en la estructura poblacional del genotipo ST213 y si pudiesen ser cepas con características singulares dentro del contexto de Norteamérica o un grupo distintivo, por lo tanto, se requiere más investigación para cubrir la mayor diversidad posible.

La baja internalización de las cepas NA-ST213 nos llevó a hipotetizar que estos aislados pueden estar usando tasas bajas de internalización para evadir al sistema inmune, generando una infección retardada tal como lo hace *S. Typhi* para causar la fiebre tifoidea¹²¹ y posteriormente compensar la baja carga bacteriana inicial con altas tasas de replicación. Este mecanismo puede ser respaldado por un estudio previo en donde se realizaron infecciones competitivas en murinos y la cepa de referencia ST19 superaba las tasas de internalización de los aislados ST213 provenientes de infecciones invasivas a los tres días de la infección²⁸, es posible que si los ensayos se hubiesen realizado de forma independiente la infección se estableciera permitiendo mayor tiempo de incubación, sin embargo la información preliminar indica que el comportamiento de las cepas NA-ST213 es extensible a varios modelos de estudio.

Si bien algunos de los comportamientos fenotípicos de las cepas NA-ST213 fueron similares, dos cepas (YUHS-05-78, YUHS-07-18) presentaron una distinción interesante, la ausencia de la proteína de membrana externa OmpD, nuestros

resultados parecerían indicar que la ausencia de esta proteína no afecta la virulencia de estas cepas ya que presentan niveles similares de adhesión, internalización y replicación que sus contrapartes con la proteína OmpD, no obstante, más trabajo es necesario para evaluar si esta diferencia juega un papel importante en la patogénesis de *Typhimurium*, dada la relevancia de esta porina para el desarrollo de candidatos vacunales. No es la primera vez que se identifica una cepa con interrupciones en *ompD*, también ha llamado la atención una cepa ST313 de África que tiene el gen interrumpido por un gen de resistencia a un antimicrobiano¹⁹. Es interesante investigar como la adquisición de genoma accesorio, así como mecanismos micro evolutivos podrían estar favoreciendo la interrupción de este gen y así desarrollar alternativas óptimas para el tratamiento de estos patógenos.

Nuestros datos resaltan la diversidad del genotipo ST213 y evidencian que los métodos actuales de tipificación como el MLST ya no poseen suficiente resolución para caracterizar a detalle genotipos emergentes, aunque aún son útiles en el seguimiento epidemiológico de brotes y como una forma inicial de clasificación¹²². En nuestros análisis tomamos esto en consideración y por ello se incluyó una subtipificación basada en los espaciadores del locus CRISPR, que nos permitió obtener información relacionada con la distribución geográfica del genotipo ST213, así como su proceso micro evolutivo. Además, en conjunto con la información de los determinantes de resistencia a antimicrobianos, los factores de virulencia, el contenido de plásmidos y profagos acoplados a la estructura poblacional nos permitió entender el dinamismo de los cambios a los que este patógeno se ha enfrentado a lo largo de su historia evolutiva, que asociados a los fenotipos de supervivencia ambiental y patogénesis nos permiten entender la expansión de este genotipo emergente considerando la diversidad más allá de las cepas de referencia y empleando enfoques integrativos en su estudio.

Estos datos, en conjunto, contribuyen a la integración del conocimiento de este genotipo emergente, vinculado a infecciones sistémicas, asintomáticas y gastrointestinales, que ha sido aislado tanto de reservorios ambientales como animales, existiendo una conexión entre las infecciones y la cadena alimenticia, parte de la relevancia de este estudio es que la información pueda impactar en su

vigilancia epidemiológica y sea útil en la toma de decisiones a nivel de salud pública desde una perspectiva integrativa aportando datos genómicos y experimentales que complementan la vigilancia epidemiológica activa realizada entre 2002-2005 y además, avive el interés de las dependencias correspondientes para realizar una nueva vigilancia activa de Salmonella en países de Norteamérica.

9 Perspectivas

El presente proyecto aún tiene muchas áreas de crecimiento y exploración, enfocadas principalmente en área bioinformática para poder generar hipótesis o proyectos interesantes que puedan ser verificados con datos experimentales, tal como, la construcción del pangenoma del genotipo ST213, y de forma independiente de las cepas NA-ST213 y EU-ST213, con la intención de entender de forma más clara las diferencias entre estas dos poblaciones, también es de interés la Identificación de pseudogenes para investigar posibles rasgos de selección antropogénica. La identificación de polimorfismos de un solo nucleótido en regiones genómicas de interés como reguladores transcripcionales o genes altamente conservados pueden ser una excelente herramienta para proponer en conjunto con las observaciones fenotípicas presentadas aquí proyectos enfocados al análisis micro evolutivo de las cepas desde una perspectiva experimental. Por último, realizar análisis de asociación genómica (WGAS) puede ser útil para identificar genes que podrían estar involucrados en fenotipos específicos en comparación con las cepas de referencia.

Durante la elaboración de este trabajo se generaron nuevas preguntas, así como resultados interesantes que podrían ser investigadas a detalle:

- Evaluar de forma detallada el papel del regulador transcripcional HilD en las cepas NA-ST213 durante la adhesión a fibroblastos 3T3.
- Explorar el mecanismo de exclusión espacial durante el nado para las cepas de *S. Typhimurium* ST19 y ST213.
- Analizar a nivel genómico las subpoblaciones mezcladas del genotipo ST213 o ST213 y ST19 en busca de características distintivas que permita entender su coexistencia e interacciones ecológicas.

- Investigar el rol de OmpD en la patogénesis de las dos cepas de *S. Typhimurium* NA-ST213 en las cuales no está presente en su versión completa.
- El rol que juegan los plásmidos en la fisiología bacteriana.
- Analizar el nivel de degradación genómica y el índice de invasividad del genotipo ST213 en comparación con otros genotipos.

10 Referencias

1. Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J. M. & Daigle, F. So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS microbiology letters* **305**, 1–13 (2010).
2. Steve Yan, S. *et al.* An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **4**, 189–204 (2004).
3. Aviv, G. *et al.* The plasmid-encoded Ipf and Klf fimbriae display different expression and varying roles in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Infantis in mouse vs. avian hosts. *PLoS pathogens* **13**, e1006559 (2017).
4. Fabrega, A. & Vila, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clinical microbiology reviews* **26**, 308–41 (2013).
5. Shu-Kee Eng, P. P., Nurul-Syakima Ab Mutalib, Hooi-Leng Ser, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance - 21553769.2015.1051243. *Frontiers in Life Science* **8**, 284–293 (2015).
6. White, A. P., Gibson, D. L., Kim, W., Kay, W. W. & Surette, M. G. Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol* **188**, 3219–27 (2006).
7. Winfield, M. D. & Groisman, E. A. Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 3687–94 (2003).
8. Crawford, R. W. *et al.* Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 4353–4358 (2010).
9. Cheng, R. A., Eade, C. R. & Wiedmann, M. Embracing Diversity: Differences in Virulence Mechanisms, Disease Severity, and Host Adaptations Contribute to the Success of Nontyphoidal *Salmonella* as a Foodborne Pathogen. *Front Microbiol* **10**, 1368 (2019).
10. Maiden, M. C. *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140–3145 (1998).
11. Lan, R., Reeves, P. R. & Octavia, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **9**, 996–1005 (2009).

12. Achtman, M. *et al.* Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS pathogens* **8**, e1002776 (2012).
13. Andam, C. P., Challagundla, L., Azarian, T., Hanage, W. P. & Robinson, D. A. 3 - Population Structure of Pathogenic Bacteria. in *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)* (ed. Tibayrenc, M.) 51–70 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-799942-5.00003-2.
14. Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J. & Achtman, M. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLoS Genet* **14**, e1007261 (2018).
15. Mu, Y. *et al.* Genomic Epidemiology of ST34 Monophasic *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium from Clinical Patients from 2008 to 2017 in Henan, China. *Engineering* **15**, 34–44 (2022).
16. Cadel-Six, S. *et al.* The Spatiotemporal Dynamics and Microevolution Events That Favored the Success of the Highly Clonal Multidrug-Resistant Monophasic *Salmonella* Typhimurium Circulating in Europe. *Frontiers in Microbiology* **12**, (2021).
17. Biswas, S., Li, Y., Elbediwi, M. & Yue, M. Emergence and Dissemination of mcr-Carrying Clinically Relevant *Salmonella* Typhimurium Monophasic Clone ST34. *Microorganisms* **7**, 298 (2019).
18. Li, W. *et al.* Clonal Expansion of Biofilm-Forming *Salmonella* Typhimurium ST34 with Multidrug-Resistance Phenotype in the Southern Coastal Region of China. *Frontiers in Microbiology* **8**, (2017).
19. Ashton, P. M. *et al.* Public health surveillance in the UK revolutionises our understanding of the invasive *Salmonella* Typhimurium epidemic in Africa. *Genome medicine* **9**, 92 (2017).
20. Owen, S. V. *et al.* Prophage-encoded phage defense proteins with cognate self-immunity. 2020.07.13.199331 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.199331> (2021).
21. Canals, R. *et al.* Adding function to the genome of African *Salmonella* Typhimurium ST313 strain D23580. *PLoS Biol* **17**, e3000059 (2019).
22. Carden, S., Okoro, C., Dougan, G. & Monack, D. Non-typhoidal *Salmonella* Typhimurium ST313 isolates that cause bacteremia in humans stimulate less inflammasome activation than ST19 isolates associated with gastroenteritis. *Pathog Dis* **73**, ftu023 (2015).
23. Singletary, L. A. *et al.* Loss of Multicellular Behavior in Epidemic African Nontyphoidal *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ST313 Strain D23580. *mBio* **7**, (2016).

24. Zaidi, M. B. *et al.* Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerging infectious diseases* **14**, 429–35 (2008).
25. Wiesner, M. *et al.* Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella* enterica serovar Typhimurium strains. *BMC microbiology* **9**, 131 (2009).
26. Wiesner, M. *et al.* *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC microbiology* **11**, 9 (2011).
27. Gómez-Baltazar, A. *et al.* Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium strains isolated from food. *Microbes Infect* 105019 (2022) doi:10.1016/j.micinf.2022.105019.
28. Wiesner, M. *et al.* A multi-drug resistant *Salmonella* Typhimurium ST213 human-invasive strain (33676) containing the bla CMY-2 gene on an IncF plasmid is attenuated for virulence in BALB/c mice. *BMC microbiology* **16**, 18 (2016).
29. Parmley, J. *et al.* ONE HEALTH AND FOOD SAFETY—THE CANADIAN EXPERIENCE: A HOLISTIC APPROACH TOWARD ENTERIC BACTERIAL PATHOGENS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE. in *Improving Food Safety Through a One Health Approach: Workshop Summary* (National Academies Press (US), 2012).
30. Destoumieux-Garzón, D. *et al.* The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. *Frontiers in Veterinary Science* **5**, (2018).
31. Calva, E. *et al.* Complete Genome Sequencing of a Multidrug-Resistant and Human-Invasive *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Genotype. *Genome announcements* **3**, (2015).
32. Achtman, M. *et al.* Genomic diversity of *Salmonella* enterica -The UoWUCC 10K genomes project. *Wellcome Open Research* **5**, (2020).
33. Sayers, E. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research* **49**, (2021).
34. Shakya, M. *et al.* Standardized phylogenetic and molecular evolutionary analysis applied to species across the microbial tree of life. *Sci Rep* **10**, 1723 (2020).
35. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution* **38**, (2021).

36. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* **16**, (1980).
37. Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D. W. & Corander, J. Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. *Nucleic Acids Res* **47**, 5539–5549 (2019).
38. Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Yi, G. & Tsan-Yuk Lam, T. ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution* **8**, 28–36 (2016).
39. R-Core-Team. R: A language and environment for statistical computing. <https://www.r-project.org/> (2022).
40. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. (2022).
41. Kaas, R., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. & Lund, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PloS one* **9**, (2014).
42. Miura, S. *et al.* A new method for inferring timetrees from temporally sampled molecular sequences. *PLoS computational biology* **16**, (2020).
43. Couvin, D. *et al.* CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research* **46**, (2018).
44. Fabre, L. *et al.* CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections. *PloS one* **7**, (2012).
45. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic acids research* **49**, (2021).
46. Bortolaia, V. *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **75**, (2020).
47. Carattoli, A. *et al.* In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, (2014).
48. CGE Server. <https://cge.food.dtu.dk/services/MyDbFinder/>.
49. Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L. & Yang, J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic acids research* **47**, (2019).

50. Arndt, D. *et al.* PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research* **44**, (2016).
51. Kassambara, A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. (2020).
52. Edwards, R. A., Keller, L. H. & Schifferli, D. M. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* **207**, 149–57 (1998).
53. Zaidi, M. B. *et al.* Burden and transmission of zoonotic foodborne disease in a rural community in Mexico. *Clin Infect Dis* **55**, 51–60 (2012).
54. Serra, D. & Hengge, R. Experimental Detection and Visualization of the Extracellular Matrix in Macrocolony Biofilms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1657**, (2017).
55. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* **9**, (2012).
56. Cabeen, M., Leiman, S. & Losick, R. Colony-morphology screening uncovers a role for the *Pseudomonas aeruginosa* nitrogen-related phosphotransferase system in biofilm formation. *Molecular microbiology* **99**, (2016).
57. Wickham, H. *et al.* Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* **4**, 1686 (2019).
58. Wei, T. & Simko, V. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (2021).
59. O'Toole, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp* (2011) doi:10.3791/2437.
60. Knodler, L. A., Nair, V. & Steele-Mortimer, O. Quantitative assessment of cytosolic *Salmonella* in epithelial cells. *PLoS One* **9**, e84681 (2014).
61. Wrande, M. *et al.* Genetic Determinants of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Proliferation in the Cytosol of Epithelial Cells. *Infect Immun* **84**, 3517–3526 (2016).
62. Huet, C., Sahuquillo-Merino, C., Coudrier, E. & Louvard, D. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. *J Cell Biol* **105**, 345–57 (1987).
63. Starr, T., Bauler, T. J., Malik-Kale, P. & Steele-Mortimer, O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella* Typhimurium. *PLoS One* **13**, (2018).

64. Di Martino, M. L., Ek, V., Hardt, W. D., Eriksson, J. & Sellin, M. E. Barcoded Consortium Infections Resolve Cell Type-Dependent *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Entry Mechanisms. *mBio* **10**, (2019).
65. Ibarra, J. A. *et al.* Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*–host cell interactions in vitro. *Microbiology* **156**, 1120–33 (2010).
66. Chen, C. Y., Nace, G. W. & Irwin, P. L. A 6 x 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods* **55**, 475–9 (2003).
67. Cano, D. A. *et al.* *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Response Involved in Attenuation of Pathogen Intracellular Proliferation. *Infect Immun* **69**, 6463–74 (2001).
68. Segura, I., Casadesús, J. & Ramos-Morales, F. Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J Microbiol Methods* **56**, 83–91 (2004).
69. Azriel, S., Goren, A., Rahav, G. & Gal-Mor, O. The Stringent Response Regulator DksA Is Required for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Growth in Minimal Medium, Motility, Biofilm Formation, and Intestinal Colonization. *Infection and immunity* **84**, (2015).
70. Darwin, K. & Miller, V. InvF is required for expression of genes encoding proteins secreted by the SPI1 type III secretion apparatus in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **181**, (1999).
71. Achtman, M. *et al.* Genomic diversity of *Salmonella enterica* - The UoWUCC 10K genomes project. *Wellcome open research* **5**, (2021).
72. Silva, C. *et al.* Complete Genome Sequence of a Human-Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strain of the Emerging Sequence Type 213 Harboring a Multidrug Resistance IncA/C Plasmid and a blaCMY-2-Carrying IncF Plasmid. *Genome Announc* **3**, e01323-15 (2015).
73. Silva, C., Calva, E., Fernández-Mora, M., Puente, J. & Vinuesa, P. Population analysis of D6-like plasmid prophage variants associated with specific IncC plasmid types in the emerging *Salmonella* Typhimurium ST213 genotype. *PLoS one* **14**, (2019).
74. Zaidi, M. B. *et al.* Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**, 398–401 (2007).

75. Petrovska, L. *et al.* Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005–2010. *Emerg Infect Dis* **22**, 617–624 (2016).
76. Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S. & Murillo, J. The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob Genet Elements* **1**, 55–65 (2011).
77. Zhang, K. *et al.* Characterization of CRISPR array in *Salmonella* enterica from asymptomatic people and patients. *International journal of food microbiology* **355**, (2021).
78. Ingle, D. J. *et al.* Evolutionary dynamics of multidrug resistant *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:- in Australia. *Nat Commun* **12**, 4786 (2021).
79. Shariat, N., Timme, R. E., Pettengill, J. B., Barrangou, R. & Dudley, E. G. Characterization and evolution of *Salmonella* CRISPR-Cas systems. *Microbiology* **161**, 374–386 (2015).
80. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. & Brüssow, H. Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 238–276, table of contents (2003).
81. Figueroa-Bossi, N. & Bossi, L. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular microbiology* **33**, (1999).
82. Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. & Bossi, L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Molecular microbiology* **39**, (2001).
83. Pilar, A., Reid-Yu, S., Cooper, C., Mulder, D. & Coombes, B. GogB is an anti-inflammatory effector that limits tissue damage during *Salmonella* infection through interaction with human FBXO22 and Skp1. *PLoS pathogens* **8**, (2012).
84. Bäumler, A. *et al.* The *pef* fimbrial operon of *Salmonella* typhimurium mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infection and immunity* **64**, (1996).
85. Mambu, J. *et al.* An Updated View on the Rck Invasin of *Salmonella*: Still Much to Discover. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, (2017).
86. Mazurkiewicz, P. *et al.* SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol* **67**, 1371–1383 (2008).
87. Valdivia, R. H. & Falkow, S. Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**, 2007–2011 (1997).

88. Grabe, G. J. *et al.* The *Salmonella* Effector SpvD Is a Cysteine Hydrolase with a Serovar-specific Polymorphism Influencing Catalytic Activity, Suppression of Immune Responses, and Bacterial Virulence. *J Biol Chem* **291**, 25853–25863 (2016).
89. Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R. & Mendoza, M. C. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella* enterica serotype typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2977–2981 (2002).
90. Koczerka, M. *et al.* The Invasin and Complement-Resistance Protein Rck of *Salmonella* is More Widely Distributed than Previously Expected. *Microbiol Spectr* **9**, e0145721 (2021).
91. Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International* **45**, 502–531 (2012).
92. Kroger, C. *et al.* An infection-relevant transcriptomic compendium for *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium. *Cell host & microbe* **14**, 683–95 (2013).
93. Hoiseth, S. K. & Stocker, B. A. D. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* **291**, 238–239 (1981).
94. Rankin, J. D. & Taylor, R. J. The estimation of doses of *Salmonella* typhimurium suitable for the experimental production of disease in calves. *Vet Rec* **78**, 706–707 (1966).
95. García, B. *et al.* Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology* **54**, 264–277 (2004).
96. Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M. & Bobylev, A. G. Congo Red and amyloids: history and relationship. *Biosci Rep* **39**, BSR20181415 (2019).
97. Reichhardt, C. *et al.* Congo Red Interactions with Curli-Producing *E. coli* and Native Curli Amyloid Fibers. *PLoS One* **10**, e0140388 (2015).
98. Xiong, L. *et al.* Flower-like patterns in multi-species bacterial colonies. *eLife* **9**, e48885 (2020).
99. Asally, M. *et al.* Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *PNAS* vol. 109 18891–18896 (2012).
100. Dietrich, L. E. P. *et al.* Bacterial Community Morphogenesis Is Intimately Linked to the Intracellular Redox State. *Journal of Bacteriology* **195**, 1371–1380 (2013).

101. Werb, M. *et al.* Surface topology affects wetting behavior of *Bacillus subtilis* biofilms. *npj Biofilms Microbiomes* **3**, 1–10 (2017).
102. Kolenda, R., Ugorski, M. & Grzymajlo, K. Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. *Frontiers in Microbiology* **10**, (2019).
103. Valdez, Y., Ferreira, R. B. R. & Finlay, B. B. Molecular Mechanisms of *Salmonella* Virulence and Host Resistance. in *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection via the Gut* (ed. Sasakawa, C.) 93–127 (Springer, 2009). doi:10.1007/978-3-642-01846-6_4.
104. Minta, J. O. & Pambrun, L. In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol* **119**, 111–126 (1985).
105. Château, M.-T. & Caravano, R. Infection of differentiated U937 cells by *Salmonella* typhimurium: Absence of correlation between oxidative burst and antimicrobial defence. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **7**, 111–118 (1993).
106. Gil-Cruz, C. *et al.* The porin OmpD from nontyphoidal *Salmonella* is a key target for a protective B1b cell antibody response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9803 (2009).
107. MacLennan, C. A., Martin, L. B. & Micoli, F. Vaccines against invasive *Salmonella* disease. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 1478–1493 (2014).
108. Gude, S. *et al.* Bacterial coexistence driven by motility and spatial competition. *Nature* **578**, 588–592 (2020).
109. Gibbs, K. A., Wenren, L. M. & Greenberg, E. P. Identity Gene Expression in *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* **193**, 3286–3292 (2011).
110. Ikuta, K. S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* **0**, (2022).
111. Okoro, C. K. *et al.* Signatures of Adaptation in Human Invasive *Salmonella* Typhimurium ST313 Populations from Sub-Saharan Africa. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, (2015).
112. Ballesteros-Nova, N. E. *et al.* Genomic Epidemiology of *Salmonella* enterica Circulating in Surface Waters Used in Agriculture and Aquaculture in Central Mexico. *Appl Environ Microbiol* **88**, e0214921 (2022).
113. Jain, P. *et al.* Antimicrobial resistance, plasmid, virulence, multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella* enterica

- serovar Typhimurium clinical and environmental isolates from India. *PLOS ONE* **13**, e0207954 (2018).
114. Gangarosa, E. J. *et al.* An Epidemic-Associated Episome? *The Journal of Infectious Diseases* **126**, 215–218 (1972).
 115. Jahan, F. *et al.* The Complex Mechanism of the *Salmonella* Typhi Biofilm Formation That Facilitates Pathogenicity: A Review. *Int J Mol Sci* **23**, 6462 (2022).
 116. Chen, C.-Y., Nguyen, L.-H. T., Cottrell, B. J., Irwin, P. L. & Uhlich, G. A. Multiple mechanisms responsible for strong Congo-red-binding variants of *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Pathogens and Disease* **74**, ftv123 (2016).
 117. Gebbink, M. F. B. G., Claessen, D., Bouma, B., Dijkhuizen, L. & Wösten, H. A. B. Amyloids - a functional coat for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **3**, 333–341 (2005).
 118. Bawn, M. *et al.* Evolution of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium driven by anthropogenic selection and niche adaptation. *PLoS Genet* **16**, e1008850 (2020).
 119. Panzenhagen, P. H. N. *et al.* Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. *International Journal of Medical Microbiology* **308**, 306–316 (2018).
 120. Bishop, A. *et al.* Interaction of *Salmonella* enterica serovar Typhi with cultured epithelial cells: roles of surface structures in adhesion and invasion. *Microbiology* **154**, 1914–1926 (2008).
 121. Keestra-Gounder, A. M., Tsolis, R. M. & Bäumler, A. J. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. *Nat Rev Microbiol* **13**, 206–216 (2015).
 122. Chattaway, M. A., Painset, A., Godbole, G., Gharbia, S. & Jenkins, C. Evaluation of Genomic Typing Methods in the *Salmonella* Reference Laboratory in Public Health, England, 2012–2020. *Pathogens* **12**, 223 (2023).