



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TESIS

**Ecología molecular de los plásmidos pCMY-2 y pSTV en aislamientos
mexicanos de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Biol. Magdalena Wiesner Reyes**

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Edmundo Calva Mercado**

Cuernavaca, Morelos

Junio del 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado y contó con el financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Lorenzo Segovia

Dr. David Romero Camarena

Dr. Edmundo Calva Mercado

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dr. Jesús Silva Sanchez

Dr. Miguel Ángel Cevallos

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann

Dr. Mario Soberón Chávez

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca de la Dirección General de Asuntos de Posgrado (DGE) de la UNAM número 238861, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología número 214945.

AGRADECIMIENTOS

Durante seis años de posgrado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca-México, es realmente mucho y a muchos lo que tengo que agradecer. Agradezco enormemente la oportunidad de poder cumplir mi sueño de estudiar un doctorado en la UNAM. Agradezco todo el conocimiento adquirido el cual continúa en expansión. Agradezco todo el crecimiento personal y emocional que ha representado estar tanto tiempo lejos de casa y el conocer muchas personas. Agradezco el poder terminar exitosamente este proyecto de vida.

Al Dr. Edmundo Calva, le agradezco enormemente la oportunidad de recibirme en su laboratorio como estudiante. Igualmente le agradezco el apoyo y la entera confianza y libertad que siempre tuve durante mi proyecto en estos seis años. Al final de esta etapa entendí, que usted le confió a mis manos el empezar una nueva línea de investigación en el grupo que ya se consolidó, por lo que me siento muy honrada y privilegiada. Siempre tendré presente sus consejos y sabias palabras. Ha sido para mí un gran honor conocerlo, ser su estudiante y le ofrezco todo mi respeto, mi admiración y cariño.

Al Dr. José Luis Puente, le agradezco también todo el apoyo, confianza y empatía que siempre me brindo durante estos años en el laboratorio y en mi proyecto.

A Claudia Silva, le agradezco enormemente los años de trabajo juntas, los cuales han sido muy fructíferos, así como las enseñanzas recibidas. También le agradezco el apoyo en los momentos difíciles y su entera confianza en mi capacidad de trabajo. Muchas gracias por compartir conmigo los momentos especiales. Nuestra amistad ha sido el fruto de una excelente relación de trabajo y estoy agradecida por eso.

A Marcos Fernández, muchas gracias por enseñarme varias de las metodologías empleadas y por la paciencia. También muchas gracias por la excelente disposición de tu parte para conmigo en el trabajo, para la facilidad de reactivos, el sacar adelante experimentos que ayudaron bastante en la evolución del trabajo. Considero que entre Claudia, Marcos y yo hicimos un excelente equipo de trabajo que resultó en excelentes trabajos publicados.

Muchas gracias a la Doctora Mussaret Zaidi por confiarnos las cepas utilizadas en este estudio, por apoyar nuestro trabajo y resolver nuestras dudas.

Al Doctor Miguel Ángel Cevallos, muchas gracias por su asesoría en la tercera parte de este proyecto, por el empeño, el tiempo dedicado y la paciencia para que esto saliera adelante. Te tengo un gran aprecio y espero que sigan resultando excelentes trabajos en nuestras manos.

A mis tutores los Doctores Lorenzo Segovia y David Romero muchas gracias por las asesorías, los tiempos extras y el estar siempre muy pendientes de mi desempeño académico. Les tengo un gran aprecio y respeto.

A los compañeros del laboratorio Mike de la Cruz, Liliana Medina, Rosalba Salgado, Carmen Guadarrama, Ana Gallego, Crispín Zavala, Esteban Rebollar, Noe Becerra, Lore, Carmen Contreras, Vero Martínez, Luay Martínez, Rafa, Víctor Antonio García, Sara Martínez, Kike Bello, Abraham Medrano, Andrés, Alejandro Huerta, Aurora Labastida, Javier Oviedo, Irene Palacios, les agradezco mucho su compañía, su amistad, su apoyo, su tiempo y todo lo que hemos pasado juntos. El tener compañeros de trabajo que hicieron muy

ameno el compartir de cada día, facilitó enormemente la realización de este trabajo. Les deseo lo mejor de la vida a cada uno.

A los Doctores Ismael Hernández, Ricardo Oropeza y Víctor Bustamante, muchas gracias por los consejos académicos, por las preguntas y las críticas constructivas al trabajo. Seguiré mi proceso de formación como investigadora teniendo en cuenta siempre sus buenas observaciones. Al Doctor Ismael también le agradezco su tiempo al escucharme en los momentos difíciles, su apoyo cuando fue necesario y los consejos dados.

A Ale muchas gracias por ser siempre la madrina, mama, alcahueta, fiestera, organizadora, y también muchas gracias por la asesoría en la realización de las mutantes para este trabajo. A panchito muchas gracias por tu amistad y por tu apoyo.

A Rosalbita y Amapola mis más sinceros agradecimientos por hacer que todo funcione y que nunca nos falte nada. Su disposición y amabilidad son parte de los pilares del laboratorio.

A Elvira, Patricia, y todos los técnicos que pasaron por el laboratorio muchas gracias por facilitarnos nuestro trabajo. En especial a Elvira Villa, quien siempre tuvo una excelente disposición al tener el material listo para trabajar cuando se requería. Tu capacidad de trabajo y tu actitud positiva con la vida misma son cosas de admirar y de aprender.

A mis compañeros de generación con quien estreche importantes lazos de amistad, Cristina Torres, Oscar Luna, Miriam Armenta, Omar Piña, Paul Rosas, Rocío Calderón, Miguel Martínez, Dago Armenta, Mauricio Barón, David Ruiz y Monserrat Sandoval. Estoy convencida que nos toco vivir la mejor generación de estudios y es por eso que los lazos se conservan hasta hoy en día. Los momentos con ustedes han sido los mejores, muchas gracias por todo y les deseo muchos éxitos a cada uno en el camino que tomen al terminar el doctorado. Colegas por siempre, amigos de corazón. En especial muchas gracias a Miriam y Cristina, por ser excelentes amigas, apoyo, consuelo, compañía, más de lo que cualquiera puede pedir y a ti Monsesita muchas pero muchas gracias por abrirme tu corazón, ser mi confidente, mi apoyo, mi eje espiritual, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser más que mi amiga te estaré eternamente agradecida.

A la comunidad colombiana que fue creciendo con los años, Mauricio Realpe, Jimmy Mena, Edna Matta, William Rodríguez, Andrea Murillo, Edna Lorena Hernández, Lilu Corrales, Estefanía Sierra, Viviana Lopez, Diego Cuervo, Checho Cristiano, Oriana Niño, Leidy Bedoya, Luis Felipe Muriel, muchas gracias a los primeros por recibirme y darme sus consejos para vivir en México y a los demás por su compañía y amistad en estos años. Hemos hechos muy buenas amistades que seguirán trascendiendo los límites continentales. Me encanta conocer gente que me hace sentir orgullosa de mi país y a todos les deseo éxitos en la vida.

A la comunidad de la roca y los escaladores, Ponchito, Pato, Rocío, Isra, André, Annie, Sini, Mapache, Luis, Claudia, Meck, Fitz, Yaneth, Miguel, Yoms, Tunko, Beto, Adriana, Juanita, Miguel C, muchas gracias por alimentar mi espíritu y hacer más fácil este trabajo. Son unas grandes personas. En ustedes he encontrado unos excelentes amigos. En especial a Poncho, gran amigo y confidente muchas gracias por estar siempre ahí y a Miguel amigo de generación y mi cómplice en los deportes alternos y extremos, muchas gracias por siempre tenerme en cuenta, compartir, siempre llevarme y traerme. Les deseo lo mejor es sus caminos.

Muchas gracias también a Mars, Werita, Sergio, Tabita, Marthicia, Lore, Cess, Ale, Bere, Aaron, Andrea P, María, Abraham, Iñigo, Miguel R, Rocío, y tantas personas que he conocido, las que me hacen falta en la

lista y que han hecho parte de mi vida durante estos seis años, con quienes hemos celebrado, compartido, con quienes he contado, a esas grandes personas que he ido conociendo y que siempre me han enseñado algo, mucha pero muchas gracias.

Cada uno de ustedes ha sido una experiencia de vida para mí, cada uno me ha enseñado cosas que me han ayudado a crecer como persona. Por eso es para mí importante agradecerles a todos, porque esta etapa de mi vida no hubiera sido tan satisfactoria sin ustedes. Espero haber dejado algo en sus corazones y que sin importar la distancia, los años o los grados académicos, podamos vernos en un futuro y seguir saludándonos tan fraternalmente como ahora. A todos les deseo muchos éxitos en cada cosa que hagan y que sean muy felices.

A todas las personas en Colombia que me apoyaron y se entusiasmaron con esta etapa en mi vida, a mis amigos, en especial Carlitos mi amigo y hermano del alma que siempre ha estado conmigo, a Marylin muchas gracias por darme el impulso necesario para estar acá, a la Doctora Elizabeth Castañeda por empezar mi formación y apoyarme siempre. A todo el Grupo de Microbiología del INS Colombia muchas gracias también por su apoyo.

Y por supuesto no podían faltar los agradecimientos más importantes a mi familia.

A mi mamá, Marcela Reyes, mi inspiración de mujer, mi ejemplo a seguir, tu fortaleza y determinación para con la vida me han enseñado que no importa lo que hagas y así las cosas no salgan como uno quiere, nunca hay fracasos y que siempre hay que seguir adelante en este camino. A mi papá, Raúl Wiesner, que me ha enseñado que somos lo que dejamos en los demás, que somos lo que enseñamos y transmitimos. Ambos han forjado en mí, la sensibilidad, la madurez, la responsabilidad. El ver más allá de mi propia humanidad. Gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme siempre en todas mis decisiones. Lo que soy se lo debo a ustedes.

A mis hermanas María del Mar y Aixa Celine, quienes me han acompañado y han sido mis amigas, el verlas crecer me llena de satisfacción. Gracias por apoyarme siempre y hacerme feliz.

A mis tías, tíos, primas, primos, sobrinas, quienes extraño y me extrañan, y que siempre me reciben con los brazos abiertos. Que han compartido todos mis logros hasta los lejanos y los han celebrado como propios. Gracias por estar siempre ahí también en la distancia.

A mi esposo José Miguel Villarreal. Llegaste cuando menos lo esperaba dando esperanza y amor a este corazón. Estoy muy agradecida con la vida por ponerte en mi camino y me siento muy afortunada por tenerte a mi lado. Te agradezco todo tu apoyo y compañía, los cuales me han ayudado mucho en la culminación de esta última etapa. Agradezco el poder seguir creciendo de la mano contigo personal y profesionalmente. Gracias por hacerme tan feliz.

Muchas gracias a todos y que sean muy felices.

Viendo hacia atrás, estoy lleno de gratitud,
viendo hacia adelante, estoy lleno de visión,
viendo hacia arriba, estoy lleno de fuerza,
viendo hacia adentro, descubro la paz.

-Oración Apache.

4	El genotipo ST 213 de <i>Salmonella Typhimurium</i> está asociado a dos tipos de plásmidos IncA/C. Segunda parte de este estudio.....	21
4.1	Adaptación a hospederos.....	22
5	Artículos.....	24
5.1	Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium strains.....	24
5.2	<i>Salmonella Typhimurium</i> ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants.....	44
6	El pA/C es compatible con el pSTV y es movilizado por el pX1 durante la conjugación. Tercera parte de este estudio.....	59
7	Hipótesis.....	60
8	Objetivo general.....	60
9	Objetivos específicos.....	60
10	Materiales y Métodos.....	61
10.1	Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	61
10.2	Prueba de incompatibilidad.....	61
10.3	Curvas de estabilidad.....	62
10.4	Experimentos de conjugación.....	62
10.5	Caracterización de las transconjugantes.....	63
10.6	Hibridaciones.....	63
10.7	Caracterización del pX1.....	63
10.8	Mutantes en pX1.....	63
10.9	Secuenciación del pColE1-like.....	64
11	Resultados.....	67
11.1	El pSTV y el pA/C son compatibles y estables en <i>E. coli</i> DH5 α y en una cepa Typhimurium ST213.....	67
11.2	El pSTV de SO1 es conjugativo.....	67
11.3	El YU39pA/C no es un plásmido conjugativo.....	69
11.4	La conjugación del YU39pA/C se debe a factores intrínsecos de la cepa donadora..	69
11.5	El pA/C transconjugante presenta diferentes tamaños en las receptoras.....	70
11.6	Los pA/C transconjugantes de mayor tamaño pueden estar co-integrados con el pX1 (de 35kb) presente en la donadora.....	72

11.7	Caracterización del pX1	74
11.8	Los pA/C co-integrados aumentan su frecuencia de conjugación hasta en cinco órdenes de magnitud.....	76
11.9	El pX1 es el responsable de la conjugación del pA/C.	76
11.10	Caracterización del pColE1-like.	77
12	Discusión.....	81
12.1	El pSTV y el pA/C son compatibles.	81
12.2	El pA/C CMY+ presente en la población Mexicana de Typhimurium, no es conjugativo.	81
12.3	El pX1 como herramienta de transferencia de otros plásmidos.	82
12.4	El pA/C como un elemento de alta plasticidad genética.	83
13	Conclusiones	87
14	Perspectivas	89
15	Referencias.	91
	ANEXOS.....	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas silvestres, transformantes y mutantes utilizadas en este estudio.	66
Tabla 2. Frecuencias de conjugación del YU39pA/C en diferentes receptoras.	70
Tabla 3. Transconjugantes pA/C analizadas.	79
Tabla 4. Resultado de las conjugaciones del pA/C y el pX1 juntos en una cepa <i>E. coli</i> DH5 α como donadora.	80

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Evolución del plásmido de virulencia (pSV) en <i>Salmonella</i>	13
Figura 2. Representación de la modularidad del genoma accesorio de las bacterias.....	14
Figura 3. Diagrama de los complejos ADN-proteína involucrados en los principales pasos de la conjugación y movilización de plásmidos en bacterias Gram-negativas, así como diferentes barreras para la conjugación..	19
Figura 4. Esquema de conjugación para la cepa donadora YU39.	65
Figura 5. Prueba de compatibilidad y estabilidad entre el pSTV y el pA/C.	68
Figura 6. Ejemplo de pA/C transconjugantes de diferentes tamaños recuperados en la receptora SO1pSTVspvC::Km..	71
Figura 7. Perfil de restricción de los D-pA/C-(transconjugantes) generado con <i>Bam</i> HI y <i>Nco</i> I.. ..	73
Figura 8. Plásmido YU39pX1.....	74
Figura 9. Sitio de inserción del EZ-Tn5 <KAN-2> en el D-pX1..	75
Figura 10. El pA/C es movilizado por co-integración con el pX1..	77
Figura 11. Caracterización del YU39pColE1-like.....	80
Figura 12. Resultados de la interacción entre el pA/C y el pX1 presentes en la cepa YU39.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

***bla*_{CMY-2}**: gen que codifica para la resistencia a ceftriaxona.

CRO: ceftriaxona.

D-pA/C pX1*taxB*::Km: cepa en la cual el gen *taxB* del pX1 ha sido reemplazado con un casete de kanamicina.

D-pX1*ydgA*::Tn5: cepa en la cual el gen *ydgA* del pX1 ha sido interrumpido con un casete de kanamicina.

D-pX1*ydfA*::Km: cepa en la cual el gen *ydfA* del pX1 ha sido reemplazado con un casete de kanamicina.

DTs : fagotipo definitivo.

EEX: exclusión de entrada.

ESCs: cefalosporinas de espectro extendido.

Fagotipificación: técnica de fenotipificación que evalúa la susceptibilidad de una bacteria a la lisis por fagos.

gem: región de modulación de la expresión génica presente en el pX1.

Inc: grupo de incompatibilidad de plásmidos.

Incompatibilidad: Incapacidad de dos plásmidos para mantenerse estables en una misma cepa.

KM: kanamicina.

MDR: multirresistencia a antibióticos.

MLST: tipificación por tipos de secuencia multilocus.

NAL: ácido nalidíxico.

Operón *spv*: operón que consta de cinco genes *spvRABCD*, que está presente en el plásmido de virulencia de *Salmonella*.

pA/C: plásmido de resistencia del grupo IncA/C.

pA/C CMY + : plásmido IncA/C que presenta la región CMY.

pA/C CMY - : plásmidos IncA/C que no presenta la región CMY.

pColE-1like: plásmido que pertenece a la familia de plásmidos pequeños ColE1.

PCR-replicon Typing: tipificación de replicones mediante PCR.

PFGE: electroforesis en gel de campos pulsados.

Proteína acopladora T4CP: proteína codificada por plásmidos conjugativos que conecta el relaxosoma al transferosoma para llevar a cabo la conjugación.

pSV: plásmido de virulencia presente en algunos serovares de *Salmonella*. Se caracteriza principalmente por la presencia del operón *spv*.

pSTV: plásmido de virulencia de *Salmonella* Typhimurium.

pX1: plásmido de resistencia del grupo IncX1.

Región CMY: fragmento de 13 Kb aproximadamente que incluye el gen *bla*_{CMY-2}.

Relaxosoma: complejo de nucleo-proteínas formado principalmente por la relaxasa y el sitio de corte dentro del *oriT*.

RIF: rifampicina.

R-M: restricción-modificación.

SGI1: isla genómica de *Salmonella* que contiene una región que codifica para múltiples resistencias a antibióticos.

SFX: exclusión de superficie.

SO1: aislado clínico número SOHS02-2 que porta el plásmido de virulencia.

ST: tipo de secuencia.

taxB: gen que codifica para la “proteína acopladora T4CP” del plásmido pX1.

Transferosoma T4SS: sistema de secreción tipo IV codificado en plásmidos conjugativos.

ydfa: gen que codifica para una proteína hipotética homologa a la proteína HhA la cual modula la síntesis de hemolisina.

ydga: gen que codifica para una proteína hipotética homologa a la Topoisomerasa III de *E. coli*.

YU39: aislado clínico número YUHS05-78 que porta los plásmidos pA/C, pX1 y pColE1-like entre otros.

RESUMEN

En México, el grupo de la Dra. Mussaret Zaidi y colaboradores inició en el año 2000 un programa de vigilancia epidemiológica que incluye cuatro Estados de México, cuyo objetivo era conocer cuáles son los enteropatógenos predominantes en la población mexicana y cuáles son los alimentos cárnicos en su transmisión. En este estudio analizamos 114 aislamientos de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium procedentes del programa de vigilancia, recuperados de muestras de humanos sanos y enfermos, así como de muestras de carnes crudas e intestinos de cerdo, de res y de pollo, mediante electroforesis de campos pulsados (PFGE) y Multilocus Sequence Typing (MLST). Se determinó la presencia del plásmido de virulencia (pSTV) característico de este serotipo, la presencia del gen plasmídico *bla*_{CMY-2} que codifica para la resistencia a ceftriaxona (CRO) y la presencia de integrones que portan genes de resistencia a diferentes antibióticos. Como resultado encontramos que nuestra población se subdividió en cuatro genotipos y dos de ellos fueron los predominantes: el tipo de secuencia ST 19 (ST 19) y el ST 213. El ST 19 se considera como el linaje ancestral de los genotipos STs213, 302 y 429 y en nuestra población se asocia a humanos y porta el pSTV típico de este serovar. El ST 213 se ha reportado sólo en México, está asociado a animales y porta el gen de *bla*_{CMY-2}. No encontramos cepas que portaran los dos plásmidos. Adicionalmente observamos que el emergente ST 213 está reemplazando al ST 19 en la población. Posteriormente determinamos que el gen *bla*_{CMY-2} lo porta un plásmido de multirresistencia IncA/C (pA/C) que se encuentra únicamente en el nuevo linaje ST 213. Al analizar los pA/Cs descubrimos dos tipos divergentes de plásmidos: el tipo I, el cual es el más abundante y disperso con una composición genética similar a los pA/C reportados en las bases de datos públicas, mientras que el tipo II es de menor tamaño y solo comparte un 30% aproximadamente con los pA/C secuenciados. Concluimos que estos plásmidos se originaron de un ancestro común pero que han divergido por inserciones o deleciones de fragmentos de ADN. Al evaluar varios de estos pA/C en conjugación, sólo la cepa YU39 fue capaz de auto-transferir el pA/C pero a muy bajas frecuencias (10^{-8}). El pA/C no es un plásmido conjugativo, pero se moviliza mediante co-integración con el plásmido pX1. Aunque la movilización entre plásmidos es un mecanismo común de transferencia horizontal, hasta la fecha no se ha reportado que el IncA/C sea de tipo movilizable por co-integración. Finalmente encontramos que tanto el ST 19 como el ST 213 pueden adquirir y mantener establemente el pSTV y el pA/C, por lo que el hecho de no encontrar los dos plásmidos en una misma cepa en nuestra población pudiera ser por limitantes en los mecanismos de la transferencia horizontal.

ABSTRACT

In México, Dr. Mussaret Zaidi and collaborators have developed an epidemiological surveillance program in the year 2000 which included four Mexican States, with the purpose of identifying the enteropathogens prevalent in human disease and contaminating raw meat from food-animals, including beef, pork and chicken. We analyzed 114 Typhimurium isolates recovered in the surveillance program by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus sequence typing (MLST). The presence of the *Salmonella* virulence plasmid (pSTV) involved in pathogenesis and the presence of the plasmidic *bla*_{CMY-2} gene that confers ceftriaxone (CRO) resistance was also evaluated. We found four genotypes in our population, two being predominant: sequence type 19 (ST 19) and ST 213. ST 19 was supported as the founder genotype of STs 213, 302 and 429. This genotype was statistically associated with human isolates and carried the pSTV plasmid. ST 213 has been reported only in Mexico, and was associated with the food-animal isolates and with the plasmidic *bla*_{CMY-2}. No strains carrying both plasmids were found in our population. A temporal pattern in which the derived ST213 is replacing the founder ST19 in the four geographic regions was observed. The *bla*_{CMY-2} gene is carried by a multidrug-resistance plasmid of the IncA/C incompatibility group and this pA/C was associated with the emergent ST 213. The pA/C was composed by two types of plasmids: type I are the most abundant and widespread, and type II are smaller and only share around 30% of their genetic composition with other reported IncA/C. We conclude that type I and II plasmids originated from a common ancestor and that the insertion and deletion of DNA stretches have shaped their evolutionary histories. Only the pA/C from strain YU39 was able to conjugate albeit at a very low frequency (10^{-8}). Thus this pA/C is a non-conjugative plasmid that can be mobilized by the formation of chimeras with an IncX1 plasmid. Although plasmid mobilization is a common mechanism of horizontal transfer between plasmids with different Inc groups, no reports about mobilization of IncA/C are available. Finally, we found that ST 19 and ST 213 can acquire and stably maintain both plasmids, thus the fact that no strains carrying both plasmids were recovered in our population could be due to the restriction in the mechanisms of horizontal transfer.

1 Introducción

1.1 *Salmonella*

El género *Salmonella* está conformado por bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos y móviles, que miden de 2-3 x 0.4-0.6 μ (McClelland *et al.*, 2001). Actualmente la clasificación taxonómica de *Salmonella* se basa en la similitud del ADN que se encuentra entre las especies y sólo dos se reconocen dentro del género: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* adicionalmente se subdivide en seis subespecies. Se han descrito más de 2500 serotipos para las dos especies de *Salmonella* y aproximadamente 1500 hacen parte de la subespecie I (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*), la cual causa el 99% de las enfermedades en el humano (Silva & Wiesner, 2009). En la actualidad, los procesos de secuenciación masiva nos han permitido conocer el tamaño aproximado del genoma a nivel de género, que se definen en términos de genoma-central y pan-genoma. El genoma-central está compuesto por todos los genes que son comunes en todas las cepas de *Salmonella* secuenciadas, mientras que el pan-genoma está conformado por todos los genes encontrados en cualquiera de las cepas de *Salmonella* secuenciadas. En *Salmonella*, Jacobsen y colaboradores recientemente analizaron 35 genomas y determinaron que el genoma-central de esta especie está compuesto por 2.800 familias de genes (copias del mismo gen identificado en diferentes genomas) mientras que el pan-genoma está conformado por 10.000 familias de genes aproximadamente (Jacobsen *et al.*, 2011).

1.1.1 Salmonelosis

La salmonelosis es la enfermedad que ocasionan las bacterias del género *Salmonella* spp. Causan un espectro de enfermedades en humanos y animales, que incluyen fiebre tifoidea y gastroenteritis muchas veces acompañada de síntomas como diarrea, fiebre y calambres abdominales, los cuales pueden durar por una semana. La infección se adquiere al consumir alimentos o agua contaminada con materia fecal de animales o de humanos colonizados por esta bacteria (WHO, 2005). Esta enfermedad se encuentra dentro del grupo de enfermedades transmitidas por alimentos; su distribución es global y afecta principalmente a niños menores de cinco años y adultos mayores. Los reportes indican que ocurren millones de casos de salmonelosis aguda anualmente y se estima al menos mueren 1,000 personas al año por esta causa (WHO, 2005). Por estas razones la salmonelosis es un problema mundial de salud pública y su manejo representa un costo elevado para los países tanto desarrollados como en vía de desarrollo, debido al aumento en la incidencia, prevalencia y multirresistencia de *Salmonella*, lo cual la convierte en un agente bacteriano de difícil tratamiento.

1.1.2 Patogénesis de *Salmonella*.

La mayoría de las infecciones por *Salmonella enterica* en humanos resultan en gastroenteritis y son causadas principalmente por los serovares Typhimurium o Enteritidis. Typhimurium produce en animales como ratones y vacas una enfermedad sistémica muy similar a la fiebre tifoidea en humano. El agente etiológico de la fiebre tifoidea la cual es una enfermedad sistémica exclusiva de los humanos, es el serovar Typhi. La fiebre tifoidea es responsable de 21 millones de nuevas infecciones por año y de la muerte de aproximadamente 600.000 personas en el mundo, lo que la

convierte en un importante problema de salud pública en los países en desarrollo (Crump *et al.*, 2004). Debido a que Typhi sólo infecta a los humanos, el modelo de infección sistémica por Typhimurium en los ratones ha sido ampliamente aplicado para entender la patogénesis e inmunidad. Es por eso que el proceso de invasión y colonización celular se encuentra descrito principalmente para Typhimurium. Brevemente, la infección sistémica inicia después de que las bacterias han resistido el ambiente ácido del estómago, cuando colonizan el intestino delgado, invadiendo principalmente las células M localizadas en las placas de Peyer en el íleo distal. Para facilitar la internalización de la bacteria, *Salmonella* induce la ondulación de la membrana de la célula M formando vacuolas, llamadas SCV (*Salmonella*-containing vacuole). Dentro de estas vacuolas, *Salmonella* es capaz de replicarse y posteriormente producir apoptosis en un periodo de 18 a 24 horas. Después de esto, *Salmonella* pasa al torrente sanguíneo diseminándose al bazo, el hígado, la médula ósea, la vesícula biliar y las placas de Peyer, produciendo infección sistémica (Zhang *et al.*, 2003). En todo este proceso invasivo, *Salmonella* utiliza los genes de virulencia, contenidos en las *islas de patogenicidad* I y II (SPI-I, SPI-II), entre otros, los cuales comprenden dos diferentes sistemas de secreción tipo III (T3SS), que se encargan de transferir múltiples efectores y proteínas al citoplasma de la célula hospedera (Hensel, 2004). Además, Typhimurium cuenta con genes accesorios que favorecen su patogenicidad, como lo es el plásmido de virulencia (pSTV), que contiene los genes *spvB* y *spvC* que confieren virulencia en el ratón (Matsui *et al.*, 2001). La ausencia de alguno de estos elementos, resulta en un fenotipo atenuado de invasión en el ratón.

1.1.3 Salmonelosis en México

Paniagua y colaboradores (Paniagua *et al.*, 2007), determinaron que *Salmonella* es el principal enteropatógeno bacteriano recuperado en las muestras fecales de niños con síntomas de diarrea en México D.F. Las serovariedades que se recuperaron con mayor frecuencia fueron el Ohio con un 28% y el Typhimurium con un 16,3%. Zaidi y colaboradores (Zaidi *et al.*, 2008), mediante la implementación de un sistema de vigilancia a través de la cadena alimenticia en cuatro Estados de México; reportaron que la prevalencia de *Salmonella* spp, es más alta en los intestinos y carne de cerdo, que en los intestinos y carne de res o de pollo. Los cuatro Estados se escogieron en base a la división que el Sistema Federal Sanitario aplica en el país. De esta forma, cada uno de los Estados representa a cada una de las 4 grandes regiones: Sonora (Región I, Noroeste), San Luis Potosí (Región II, Golfo-central), Michoacán (Región III, Pacífico-central), y Yucatán (Región V, sureste) (Zaidi *et al.*, 2008). En este programa también se recuperaron muestras de *Salmonella* en niños con cuadros invasivos, en niños con diarrea y en niños asintomáticos (Zaidi *et al.*, 2008). La implementación de este sistema en México, mostró que *Salmonella* es un problema de salud de alto riesgo y que la carne de animal lista para el consumo humano es la principal fuente de salmonelosis en México. Esta problemática se presenta con mayor frecuencia en los Estados que de acuerdo al estudio tienen los niveles socioeconómicos más bajos como lo son Yucatán y San Luis Potosí (Zaidi *et al.*, 2008).

1.1.4 *Salmonella* Typhimurium

Salmonella Typhimurium es el principal causante de salmonelosis tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El Sistema Nacional de Vigilancia de Estados Unidos reporta que Typhimurium fue el serovar predominante durante el 2003 con 6,631 (19.7%) aislamientos (CDC, 2005). En Europa la red de vigilancia Enter-net, reporta este serovar como el segundo prevalente desde 1998 hasta 2003, con 18,937 aislamientos para el último año, después de Enteritidis (Fisher & Enter-Net, 2004). En México, entre el 2004 al 2006, Typhimurium fue el segundo serovar recuperado en muestras de niños con diarrea en la ciudad de México (Paniagua et al., 2007). En el sistema de vigilancia implementado por el grupo de la Doctora Zaidi, Typhimurium fue el principal serovar recuperado de pacientes enfermos (22.2%), incluyendo cuadros de bacteremia y meningitis; así como de carne de cerdo (10.2%) (Zaidi et al., 2008).

La importancia clínica y epidemiológica de este serovar reside en su asociación con la multirresistencia a diferentes familias de antibióticos, entre los cuales se encuentran aquellos que son frecuentemente usados para tratar a los pacientes con salmonelosis aguda, lo que genera fallas terapéuticas que pueden llevar a la muerte. La multirresistencia en este serovar, inicialmente se asoció con el fagotipo DT104 desde finales de la década de 1980. Inicialmente se reportó en el Reino Unido y rápidamente se diseminó a nivel global, causando enfermedad tanto en animales para consumo, como en humanos. Estas cepas tienen un fenotipo pentarresistente definido como la resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas, y cuyos genes responsables se encuentran codificados en la isla genómica I (SGI1) integrada en el cromosoma (Threlfall, 2002). Posteriormente, con el uso de herramientas de tipificación molecular se demostró que la dispersión de estas cepas junto con su resistencia es de tipo clonal (Davis *et al.*, 2002, Davis *et al.*, 1999).

Sin embargo, en las últimas décadas se ha descubierto que la presencia de plásmidos grandes que generan la misma pentarresistencia representa un problema adicional en este serovar, ya que estos no solo se dispersan más rápido en la población, sino que además adquieren los genes de resistencia contra los antibióticos de última generación como las cefalosporinas de tercera generación, lo que los convierte en un problema importante de salud pública muy difícil de erradicar (Chu & Chiu, 2006).

1.2 Importancia clínica de la resistencia a antibióticos

Las enfermedades gastrointestinales ocasionadas por los enteropatógenos transmitidos a través de alimentos mayoritariamente son auto-limitadas; esto es, se resuelven por sí solas y no necesitan tratarse con antibióticos. Sin embargo, los tratamientos son necesarios cuando los pacientes presentan cuadros febriles por varios días y cuando existe sospecha de una infección sistémica.

Actualmente, el número de aislamientos resistentes a los antibióticos utilizados para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales se ha incrementado notablemente. Serovares de *Salmonella* no-Typhi, como por ejemplo Typhimurium, Enteritidis y Cholerasuis, junto con *Campylobacter*, son las bacterias más comunes que causan cuadros de diarrea aguda en países industrializados. Estas bacterias portan o pueden adquirir fácilmente, genes de resistencia para la

mayoría de los antibióticos. Cuando los antibióticos se emplean continuamente en la cadena de producción de alimentos para el consumo humano, se seleccionan las bacterias que portan estos genes de resistencia y posteriormente son transmitidas al humano (Molbak, 2005).

En *Salmonella*, durante la última década, el número de reportes de aislamientos resistentes a los antibióticos de elección para cuadros invasivos en adultos (fluoroquinolonas) y en niños (cefalosporinas de tercera generación) se ha incrementado. Estos aislamientos tienen su origen en alimentos contaminados con bacterias multirresistentes, lo que representa un problema para los clínicos ya que se reducen las opciones de tratamiento y se generan fallas terapéuticas (Carattoli *et al.*, 2002, Chiu *et al.*, 2006, Fey *et al.*, 2000, Fluit, 2005, Gupta *et al.*, 2003, Nakaya *et al.*, 2003).

Adicionalmente, es importante resaltar que los aislamientos de *Salmonella* multirresistentes incrementan su capacidad de generar enfermedades invasivas, hospitalización y muerte, a través de diversos mecanismos, como el de combinar elementos de virulencia con genes de resistencia, los cuales influyen en la regulación de la virulencia y aumentan su capacidad de prevalecer y de dejar descendientes (Fluit, 2005, Guerra *et al.*, 2004, Molbak, 2005).

1.2.1 Resistencia a cefalosporinas de tercera generación

La resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido (ESCs) se ha encontrado en diferentes serovares de *Salmonella* y los genes responsables se encuentran en plásmidos que se diseminan rápidamente entre organismos entéricos (Su *et al.*, 2004). En el 2004, las salmonellas resistentes a ESCs se reportaron en 43 países, y los genes principalmente implicados, son del tipo CTX-M y del tipo CMY. Dentro de estas últimas, la enzima CMY-2 codificada por el gen *bla*_{CMY-2} se ha reportado en 32 serovares de *Salmonella* distribuidos en varios países en los cuatro continentes (Arlet *et al.*, 2006).

El gen *bla*_{CMY-2} fue reportado inicialmente en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*, recuperado de un paciente en Grecia en 1990. Esta proteína presenta un porcentaje de similitud del 95,8% con la proteína cromosomal AmpC de *Citrobacter freundii*, por lo que se determinó que este gen se movilizó del cromosoma a los plásmidos, y posteriormente estos plásmidos fueron adquiridos por *K. pneumoniae* y *Escherichia coli* (Bauernfeind *et al.*, 1996). El primer reporte clínico del gen *bla*_{CMY-2} plasmídico en *Salmonella* fue en el serovar Senftenberg en 1997, en Argelia (Koeck *et al.*, 1997). Posteriormente, en 1999 en EEUU, se reportó la primera cepa Heidelberg multirresistente con este gen (Horton *et al.*, 1999). En Typhimurium, el primer reporte fue en el 2000 y se demostró por PFGE su transmisión directa a partir de ganado (Fey *et al.*, 2000). En animales, el primer reporte de diferentes serovares de *Salmonella* resistentes a cefalosporinas tipo *bla*_{CMY-2} fue en el 2000, junto con algunos aislamientos clínicos. El análisis por PFGE indicó que la diseminación de ESCs, no se debía a una cepa epidémica sino que ocurría a través de fenómenos de transferencia horizontal (Winokur *et al.*, 2000). A partir de estas fechas, el reporte de aislamientos de diferentes serovares de *Salmonella*, además de otros enteropatógenos que portan plásmidos con el gen *bla*_{CMY-2}, se ha incrementado en varios países. Es así como se han reportado plásmidos desde 10 kilobases (Kb), recuperados en menor frecuencia, hasta plásmidos de 170 Kb, los cuales son más comunes (Dunne *et al.*, 2000, Winokur *et al.*, 2000).

Sin embargo, entender la epidemiología del plásmido que porta el gen *bla*_{CMY-2} no ha sido fácil, debido a su diversidad, su promiscuidad y a su variabilidad con respecto a la forma de diseminación. Al inicio de este estudio se conocía que la diseminación del plásmido que portaba este gen era de manera clonal en aislamientos de Typhimurium recuperados en Rumania y Taiwán, en aislamientos de Newport recuperados en EEUU, y en algunos aislamientos de *E. coli* en España (Daniels *et al.*, 2007, Giles *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2005, Miriagou *et al.*, 2002, Rankin *et al.*, 2002). De la misma manera, se reportó la diseminación intercontinental de un clon de Bredeney recuperado en Canadá en 2002 con un aislamiento recuperado en Inglaterra y Gales en 2004, los cuales presentaron el mismo patrón de PFGE (Allen & Poppe, 2002, Liebana *et al.*, 2004). En los estudios anteriormente mencionados y en aquellos en donde no se observó relación clonal, adicionalmente se analizó la transferencia del plásmido, el cual, en algunos trabajos se conjugó exitosamente a cepas de *E. coli* y *Salmonella* (Allen & Poppe, 2002, Dunne *et al.*, 2000, Fey *et al.*, 2000, Giles *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2005, Liebana *et al.*, 2004, Navarro *et al.*, 2001, Poppe *et al.*, 2005, Yan *et al.*, 2003), mientras que en otros sólo se logró su transferencia por electroporación, indicando que el plásmido no conserva el mismo mecanismo de dispersión en las diferentes bacterias (Kruger *et al.*, 2004, Liebana *et al.*, 2004, Miriagou *et al.*, 2002, Winokur *et al.*, 2000, Winokur *et al.*, 2001). Todos estos resultados nos muestran que el gen *bla*_{CMY-2} plasmídico se está dispersando tanto de manera clonal, como en el caso del serovar Newport, así como por transferencia horizontal entre diferentes especies. Estos dos mecanismos de diseminación favorecen la amplia distribución observada en los enteropatógenos (Daniels *et al.*, 2007).

1.3 Epidemiología molecular

El análisis fenotípico y genotípico de aislamientos de diferentes fuentes, permite determinar si tienen el mismo o diferente origen, y conocer la manera en que se están dispersando. Es por eso que los serovares de *Salmonella* adicionalmente se subdividen para identificar líneas clonales e identificar las relaciones entre ellas. Dentro de la fenotipificación encontramos técnicas como la serotipificación y la susceptibilidad a antibióticos, las cuales permiten subdividir los aislamientos, sin embargo, estas técnicas no logran discriminar aislamientos altamente relacionados. Para esto se utilizan métodos como la fagotipificación, en la cual se evalúa la susceptibilidad a la lisis de las bacterias por un determinado tipo de fago y de esta manera se agrupan en fagotipos definitivos (DTs) (Kropinski *et al.*, 2007)

Para complementar estas técnicas, se utilizan métodos moleculares como la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) y la tipificación por secuencias multi-locus (MLST). Las dos técnicas se basan en el análisis del ADN genómico. La primera consiste en digerir el ADN total con enzimas de restricción y comparar los aislamientos de acuerdo al número de bandas que se originan en una electroforesis. La segunda consiste en el análisis de secuencias parciales de siete genes conservados, en donde para cada gen, cada secuencia diferente se identifica como un alelo y los alelos identificados generan un perfil alélico que se define como tipo de secuencia o “sequence type” (ST) para cada aislamiento (Maiden *et al.*, 1998, Swaminathan *et al.*, 2001).

Salmonella se caracteriza por presentar una gran variedad de factores de virulencia y recientemente de resistencia. Algunos se encuentran distribuidos ampliamente en varias de las subespecies, mientras otros se asocian a uno o pocos serovares. Los genes de virulencia codifican

para factores que modifican la fisiología celular del hospedero o protegen a la bacteria de los sistemas de defensa del mismo. Estos genes se han identificado como grupos en el cromosoma bacteriano, los cuales se han denominado como “islas de patogenicidad” o en elementos genéticos transmisibles como fagos o plásmidos, dentro del cual el más estudiado para *Salmonella* es el plásmido de virulencia (Fierer, 2001).

Cuando un patógeno se disemina clonalmente, los determinantes intrínsecos de virulencia y de resistencia a diferentes agentes son segregados a las siguientes generaciones. Adicionalmente, las bacterias pueden adquirir nuevas secuencias de ADN por transferencia horizontal a través de elementos móviles como transposones, integrones y plásmidos, los cuales pueden insertarse en el cromosoma ó en los plásmidos nativos de las bacterias, o mantenerse como nuevos plásmidos. Estos, pueden conferir a las bacterias ventajas adaptativas que aseguran su supervivencia. De esta manera el nuevo ADN se estabiliza y es heredado a las siguientes generaciones. La diseminación de resistencia a antibióticos en cepas patógenas puede deberse a una de estas estrategias o a las dos alternativas simultáneamente.

1.3.1 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

En esta técnica se toma el ADN total de la bacteria y es digerido con enzimas de restricción de corte poco frecuente, lo cual resulta en fragmentos de diferentes tamaños que migran a lo largo de un gel, por impulsos eléctricos (Salysers & Whitt, 2002).

El principio de la separación por PFGE es el siguiente: se aplican dos impulsos eléctricos. Cuando el primer impulso eléctrico se aplica al gel, la molécula de ADN se alarga en la dirección del impulso y empieza a migrar en el gel. Luego ese pulso se apaga y se activa un segundo pulso eléctrico en un ángulo diferente al anterior. El ADN debe cambiar su conformación y reorientarse para comenzar a migrar en la dirección del segundo pulso. La diferencia de tamaños afecta este proceso tomando más tiempo en las moléculas grandes que en las pequeñas (Birren & Lai, 1993).

El termino original de PFGE lo acuñaron Schwartz y Cantor en 1984 para cualquier gel que corriera usando pulsos eléctricos múltiples alternados; sin embargo varios aparatos se han derivado del original y los nombres también han cambiado.

1.3.2 MLST

Dentro de estas metodologías, la tipificación por secuencia de multilocus (Multilocus Sequence Typing-MLST) es una de las más ampliamente utilizadas en diferentes enteropatógenos (Enright & Spratt, 1999). Los estudios de MLST en *Salmonella*, basados en su reproducibilidad y rapidez, se han encaminado hacia la evaluación de la técnica como una herramienta útil para la investigación de brotes (Kotetishvili *et al.*, 2002), en programas de vigilancia epidemiológica (Torpdahl *et al.*, 2005) y para investigar la capacidad de discriminación en aislamientos de *Typhimurium* procedentes de una misma fuente (Fakhr *et al.*, 2005). Actualmente, existe un sitio Web disponible en Internet para acceder a la base de datos de los tipos de ST descritos para *Salmonella* (<http://www.ucc.ie>). En él se utilizan siete genes que codifican para diferentes enzimas; *aroC* codifica para la corismato sintasa, forma el intermediario aromático corismato, precursor para la síntesis de amino ácidos como fenilalanina, tirosina y triptofano; *dnaN* que

codifica para la subunidad β de la ADN polimerasa III; *hemD* que codifica para la uroporfirinógeno III sintasa, involucrada en la transferencia de electrones; *hisD* que codifica para la histidinol hidrogenasa, de la vía de biosíntesis de histidina; *purE* que codifica para la 5 fosforibosil-N-carboxiaminoimidazol - NCAIR, para la biosíntesis de adenosín mono fosfato (AMP) y guanosín mono fosfato (GMP); *sucA* el cual codifica para la subunidad E1 de la enzima 2-alfacetoglutarato deshidrogenasa, que participa en la formación de succinil-CoA; y *thrA* que codifica para la aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I, para la biosíntesis de treonina. Este banco de datos en la red, contiene una secuencia base para cada gen, la cual se identifica con el número 1. Las diferentes sustituciones de nucleótidos encontradas para cada gen se denominan como alelos y se numeran de acuerdo al orden en el que se van reportando. Las diferentes combinaciones de los alelos generan el respectivo tipo de secuencia (ST).

En la fecha en que iniciamos este estudio, se habían identificado 203 ST para *Salmonella* spp que incluían 43 serovares de aislamientos clínicos, de alimentos y de animales. Para el serovar Typhimurium, se habían registrado 39 aislamientos con 10 ST diferentes, en donde el ST 19 fue el predominante, seguido por el ST 128 con 6 aislamientos tanto en muestras clínicas como de animales. Los restantes ST tenían de 1 a 3 aislamientos.

Gracias a la gran aceptación de esta metodología en la tipificación de *Salmonella*, el crecimiento de esta base de datos ha sido considerable en los últimos años. Los resultados obtenidos por Achtman y colaboradores, demostraron que los STs correlacionan muy bien con los serovares y que el MLST es una herramienta valiosa para la identificación de linajes y para observar la diversidad de los serovares más comunes. Es por eso que ellos proponen reemplazar la serotipificación de *Salmonella* con el uso del MLST y retirar el concepto de serovar por otro que esté basado en la genética de poblaciones (Achtman, 2012).

1.4 Elementos accesorios del genoma

1.4.1 Plásmidos

Los plásmidos son elementos de ADN extra-cromosomal que pueden constituir hasta el 30% del genoma de una bacteria. Generalmente tienen forma circular y se replican de manera independiente al cromosoma. El término de plásmido fue acuñado en 1952 por el genetista Joshua Lederberg, quien además fue el primero en describir el proceso de conjugación bacteriana (ver más adelante). Los plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos en los tres dominios de la vida. Estos contienen un módulo con genes que les permiten mantenerse, propagarse y transferirse, los cuales conforman el esqueleto del plásmido. Adicionalmente portan módulos de elementos accesorios, que incluyen genes que confieren beneficios para la célula hospedante, como los de resistencia a antibióticos, genes de virulencia, genes para desintoxicación por metales pesados ó genes que permiten utilizar nuevas fuentes de carbono. Los plásmidos también aportan variación genética y actúan como sustrato para recombinación, por lo que son elementos importantes para el flujo genético (Sorensen *et al.*, 2005, Norman *et al.*, 2009).

1.4.2 Clasificación de plásmidos

Con el tiempo se han implementado varios sistemas para poder clasificar, separar y analizar los plásmidos. Morfológicamente, los plásmidos se pueden dividir de acuerdo a su tamaño en plásmidos de bajo o de alto peso molecular. Los plásmidos de bajo peso molecular son elementos de 10 Kb o menos, que generalmente se encuentran en multicopia. Por lo general, sólo contienen los genes involucrados en su replicación y unos pocos presentan uno o dos genes de resistencia a antibiótico u otros agentes químico-tóxicos. Los plásmidos de alto peso molecular pueden ir desde 30 Kb hasta cientos de miles de pares de bases, y se encuentran en una o pocas copias por bacteria y su replicación en la mayoría de los casos esta acoplada a la replicación del cromosoma bacteriano. Su gran tamaño, entre otras cosas, se debe a la presencia de los genes involucrados en su auto-transferencia o conjugación. Se han propuesto varios esquemas para clasificar estos plásmidos. El más antiguo y más ampliamente utilizado, consiste en la clasificación de acuerdo a su grupo de incompatibilidad (Inc) el cual está determinado por el origen de replicación (ver más adelante).

Inicialmente, esta clasificación se realizaba hibridando con las sondas marcadas radioactivamente de cada uno de los grupos Inc, haciéndola una técnica tardada y costosa (Couturier *et al.*, 1988). Recientemente, Carattoli y colaboradores (Carattoli *et al.*, 2005), utilizando como moldes las secuencias de las sondas utilizadas por Couturier, desarrollaron una PCR múltiple para identificar de manera más eficiente los grupos Inc de los plásmidos presentes en los enteropatógenos. Esta metodología resultó tan exitosa, que ya se implementa como técnica de genotipificación de aislamientos en los programas de vigilancia, debido a que la identificación y clasificación de plásmidos es muy importante en los patógenos porque estos portan algunos genes de resistencia y de virulencia. Su comparación se utiliza como marcador genético para entender la dispersión de algunas cepas. También es muy útil para conocer la forma en que los plásmidos se diseminan y el rango de hospederos en el que se pueden encontrar (Couturier *et al.*, 1988).

Para el segundo esquema de clasificación se utiliza la secuencia de la proteína *relaxasa*, codificada en el mismo plásmido, y se basa en la división de plásmidos transferibles ya sean del tipo conjugativo o movilizable (que se transfieren sólo utilizando la maquinaria de conjugación de un plásmido conjugativo). El análisis filogenético de las secuencias de las proteínas *relaxasas* disponibles en las bases de datos, permitió separar los plásmidos en seis familias MOB. Este esquema se propuso recientemente como una alternativa a la clasificación por grupo Inc, pero su aplicación todavía es muy limitada (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

1.4.3 Incompatibilidad entre plásmidos

La incompatibilidad entre dos plásmidos es definida como su incapacidad para co-existir establemente en una misma célula o para mantenerse en la población a través de muchas generaciones. La forma más común de realizar una prueba de incompatibilidad consiste en introducir un plásmido A por transformación o conjugación en una célula, en la cual reside un plásmido B pre-establecido. La selección (que puede ser con antibiótico) se realiza para el plásmido entrante A y después, en las colonias se evalúa la presencia del plásmido B. Si el plásmido B no es encontrado en la célula después del experimento, entonces estos dos plásmidos

se declaran incompatibles. Si por el contrario, las colonias evaluadas contienen los dos plásmidos, entonces se dice que son compatibles. En ocasiones se observan los dos plásmidos en sólo una fracción de la población, por lo que es necesario en estos casos realizar una prueba de estabilidad o prueba de segregación. Ésta consiste en sub-cultivar por varias generaciones, sin ningún tipo de selección la célula que contiene los dos plásmidos. Al final se evalúa nuevamente la presencia de los dos plásmidos y se determina si uno de los dos es menos estable.

Los principales genes responsables del fenómeno de incompatibilidad, son aquellos que están involucrados en los procesos de replicación, mantenimiento y partición del plásmido, como los genes *rep/ori* y *par*, así como los que codifican para las moléculas de ARN que se encargan de controlar el proceso de replicación (genes *cop*). Cuando dos plásmidos utilizan el mismo mecanismo de replicación o de segregación, compiten por las mismas moléculas y los mismos sitios de unión en la membrana, lo que finalmente resulta en la eliminación de uno de los plásmidos en la población (Novick, 1987). Adicionalmente, existe el fenómeno de *exclusión* que también genera incompatibilidad entre plásmidos de una misma familia, el cual además está involucrado en no permitir la transferencia de una molécula de ADN durante la conjugación.

1.5 Plásmidos en *Salmonella*

1.5.1 Plásmido de virulencia

De los aproximadamente 2500 serovares de *Salmonella*, el plásmido de virulencia (pSV) está presente sólo en ocho serovares (no-tifoideos) de la subespecie I *enterica*, cuyo tamaño varía entre 50 a 285 Kb. Estos plásmidos tienen como característica común la presencia del operón *spv* que está compuesto por cinco genes *spvRABCD*. Sin embargo, no todas las subespecies de *Salmonella* portan este operón en un plásmido. Boyd y colaboradores encontraron que las subespecies I, II, IIIa, IV y VII tienen una copia cromosomal del operón *spv* y sugieren que la presencia de este confiere alguna ventaja selectiva [Boyd, 1998 #85].

El pSV está asociado a infecciones extra-intestinales y la presencia del operón *spv* le confiere el fenotipo virulento en el ratón, desempeñando un papel importante en el proceso de invasión celular en la célula huésped (Guiney & Fierer, 2011). Este operón *spv* está regulado tanto por las condiciones ambientales como por las del crecimiento de la bacteria (Chu & Chiu, 2006). Mutaciones en los cinco genes han demostrado que sólo tres son esenciales para el fenotipo virulento en el ratón, el *spvR* y los genes *spvBC*. El primero de ellos, el gen *spvR* es el regulador transcripcional positivo del operón, el *spvB* codifica para una mono ADP-ribosil transferasa, la cual regula la conversión de G-actina a F-actina, desestabilizando el citoesqueleto de la célula (Lesnick *et al.*, 2001) y el *spvC* codifica para una fosfotreonina-liasa que inhibe la respuesta proinflamatoria localizada en el órgano infectado, facilitando el crecimiento bacteriano (Mazurkiewicz *et al.*, 2008). Del pSV, se han analizado otros genes que favorecen el proceso de invasión como el *rck* y el *rsk* que se requieren para modular la respuesta inmune, ya que generan resistencia al complemento y el *traT* que codifica para una proteína de *exclusión de superficie* que evita la transferencia lateral (Chu & Chiu, 2006). Otros genes importantes y únicos presentes en los pSV, son los operones *pef* y *fae* que codifican para la formación de fimbrias (Rotger & Casadesus, 1999). Aunque los pSV comparten características comunes y se pueden intercambiar entre serovares sin afectar la

virulencia de la cepa, se ha visto que son naturalmente específicos para cada serovar. Los análisis de secuencias de estos plásmidos han revelado que su esqueleto está altamente conservado y sugiere que provienen de un ancestro común que ha divergido en dos grupos. El primer grupo comprende los pSV de los serovares Dublin y Gallinarum mientras que el segundo grupo está compuesto por los pSV de los serovares Typhimurium, Enteritidis, Cholerasuis y probablemente Abortusovis. Aparentemente, la mayor diferencia entre los dos grupos es la presencia del operón *pef* y la presencia de dos orígenes de replicación en el segundo grupo (Figura 1) (Chu *et al.*, 2008). De todos estos plásmidos, el único conjugativo es el pSV de Typhimurium (Rychlik *et al.*, 2006).

El plásmido de virulencia de Typhimurium (pSTV) es un elemento característico de este serovar con un tamaño promedio de 90-100 Kb (McClelland *et al.*, 2001). Aunque es predominante en la población (el 90% de los aislamientos de Typhimurium lo poseen) existen líneas clonales que no lo contienen (Olsen *et al.*, 2004). Pertenece al grupo IncFIIA y posee un segundo origen de replicación no funcional (IncFIB). Es un elemento altamente conservado en aislamientos clínicos de este serovar (Chu *et al.*, 1999). Se ha reportado que el pSTV tiene la capacidad de auto-transferirse (Ahmer *et al.*, 1999). El papel del pSTV en la virulencia para el modelo del ratón está muy bien documentado. Se sabe que la presencia de este plásmido potencia la habilidad de Typhimurium para crecer dentro de células del retículo endotelial y producir enfermedad mortal sistémica (Guiney & Fierer, 2011). Sin embargo, la asociación de la presencia del pSTV con los casos de bacteremia en humanos aún no es clara. En estos casos lo que se determina es cuantos aislamientos recuperados de sangre, llevan el pSTV y así se establece la asociación. Existen reportes, en donde la presencia de este plásmido en aislamientos de Typhimurium y Enteritidis está asociado a casos de enfermedad sistémica, contrario a lo reportado posteriormente en otro estudio para aislamientos clínicos de Typhimurium, en donde el pSTV no se identificó en todas las cepas (Chiu *et al.*, 2000, Chiu *et al.*, 1999). Estos resultados siguen sin contestar la pregunta acerca del papel que juega este plásmido en la patogénesis en humanos.

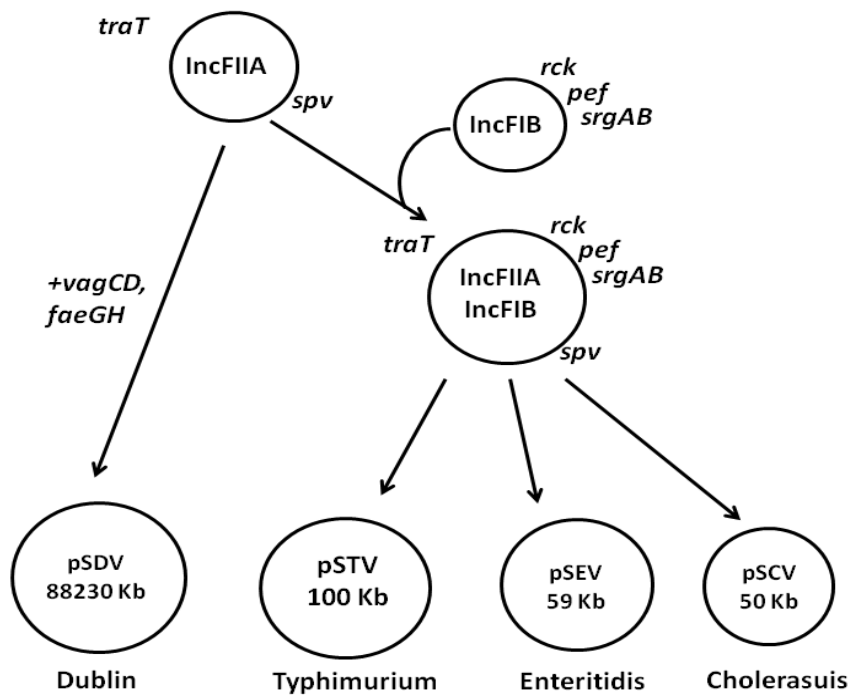


Figura 1. Evolución del plásmido de virulencia (pSV) en *Salmonella*. El ancestro original consistía de un replicón IncFIIA el cual portaba los genes del operón *spv*, *traT* y los genes para la conjugación. Este plásmido se fusionó con un plásmido del grupo IncFIB que llevaba los genes *rck*, *pef* y *srgAB*. Los genes de conjugación se mantuvieron solo para el pSV de Typhimurium mientras que para los otros pSV se degeneraron hasta eliminarse completamente. Adaptado de (Rychlik et al., 2006).

1.5.2 Plásmidos de resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos está frecuentemente asociada a elementos móviles como transposones e integrones. Los transposones son estructura genéticas que saltan de un lugar a otro del genoma, gracias a la enzima transposasa codificada por ellos mismos. Los integrones son elementos genéticos que capturan y expresan genes mayoritariamente de resistencia (Fluit, 2005, Levin & Bergstrom, 2000, Ochman *et al.*, 2000). Los integrones se pueden insertar dentro de un transposón, y el transposón dentro de un plásmido conjugativo el cual es el que, en última instancia, disemina la resistencia a otras bacterias (Figura 2) (Norman et al., 2009).

Además del pSV, *Salmonella* puede portar más plásmidos de diferentes tamaños. El análisis de aislamientos de *Salmonella* recuperados desde la llamada era pre-antibióticos (de 1917 a 1950), mostró la presencia de plásmidos de alto peso molecular de 200 Kb o más que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncI1, IncX e IncFII y que se caracterizan por portar genes de resistencia a antibióticos (Jones & Stanley, 1992). Actualmente, estos plásmidos todavía se recuperan en aislamientos clínicos junto con plásmidos de otros grupos como IncH1, IncN, IncP y los elementos emergentes IncL/M e IncA/C (Rychlik et al., 2006, Welch *et al.*, 2007).

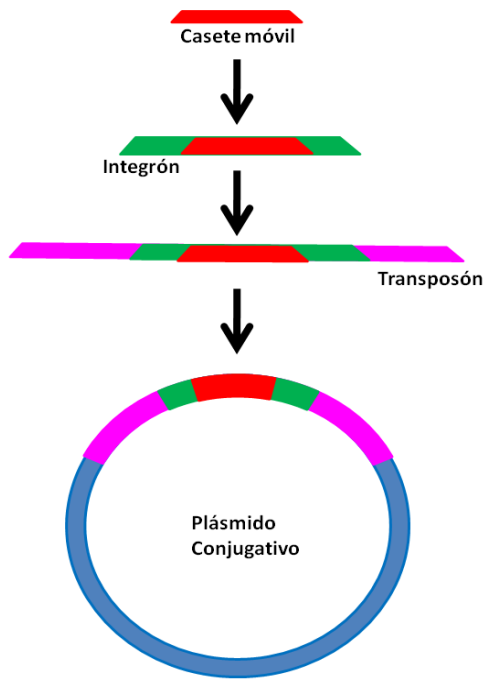


Figura 2. Representación de la modularidad del genoma accesorio de las bacterias.

Se ilustra la inserción de un casete móvil que contiene un gen (generalmente de resistencia a antibióticos) en un integrón, el cual puede integrarse en un transposón (generalmente conteniendo resistencias a antibióticos y otras sustancias tóxicas, como desinfectantes o metales pesados), el cual a su vez se inserta en un plásmido conjugativo (que puede contener otras resistencias y factores de virulencia). Finalmente este plásmido se disemina por transferencia lateral entre las poblaciones bacterianas. Adaptada de Norman y colaboradores (Norman et al., 2009).

1.5.3 Evolución de los plásmidos que confieren multiresistencia en *Salmonella*

Al inicio de los 1970s, en aislamientos europeos se describieron plásmidos del grupo IncFI que codificaban para múltiples resistencias a antibióticos. En la década de los 1980s, la resistencia a gentamicina en Typhimurium estaba codificada por plásmidos conjugativos del grupo IncI. En la década de los 1990s, apareció la resistencia a beta-lactámicos, codificada en los plásmidos de los grupos IncQ, IncP, IncF, IncH1 e IncN. A finales de los 1990s y principios del 2000 emergió la resistencia a ESCs en plásmidos del grupo IncL/M. Finalmente, del año 2000 hasta la fecha, el mayor problema de multiresistencia está dado por la presencia de plásmidos IncA/C los cuales no sólo confieren resistencia a ESCs junto con cuatro o cinco familias de antibióticos (Carattoli, 2003), sino que además a partir del 2010 se reportó la adquisición del gen *bla*_{NDM-1}, que confiere resistencia a metalo-betalactamasas, antibióticos de última generación (Sekizuka *et al.*, 2011).

1.5.4 IncA/C

El grupo de incompatibilidad IncA/C está constituido por plásmidos con un amplio rango de hospederos (Llanes *et al.*, 1996). Actualmente, este grupo es uno de los principales dispersores de multiresistencia en enteropatógenos, debido a que portan además de genes de resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, estreptomina y sulfas, el gen *bla*_{CMY-2} y la resistencia a amonios cuaternarios. CMY-2 confiere resistencia al antibiótico ceftriaxona (CRO) que se usa como última alternativa en las infecciones sistémicas por *Salmonella* no-tifoideas. En el ámbito veterinario se

utiliza su homólogo ceftiofur. En la última década, los epidemiólogos han enfocado sus esfuerzos en conocer el modelo de evolución y dispersión de este nuevo elemento (Call *et al.*, 2010, Fricke *et al.*, 2009, Welch *et al.*, 2007, Fernandez-Alarcon *et al.*, 2011). Durante los primeros análisis de este plásmido (antes de conocer su grupo de incompatibilidad), se observó que los perfiles de restricción de los plásmidos con el gen *bla*_{CMY-2} eran variables, por lo que se estandarizó una metodología para poder clasificarlos. Para esto se hibridaron los perfiles de restricción con el gen *bla*_{CMY-2} y se clasificaron los plásmidos en cuatro tipos denominados A, B, C y D (Carattoli *et al.*, 2002, Giles *et al.*, 2004).

Posteriormente, Carattoli y colaboradores encontraron que los plásmidos CMY-2 de EEUU, clasificados anteriormente como tipo A por restricción, correspondían al grupo IncA/C y que los plásmidos tipo B al grupo IncI1 (Carattoli *et al.*, 2006).

Los estudios recientes han comparado la secuencia del plásmido ancestral para este grupo pRA1, con varios plásmidos pA/C recuperados en diferentes enterobacterias. El análisis de siete secuencias de plásmidos, mostró que los pA/C comparten un esqueleto común, incluyendo el origen de replicación y los genes involucrados en la conjugación (Fricke *et al.*, 2009, Welch *et al.*, 2007). Sin embargo, en los plásmidos recientes se observa la inserción en sitios conservados, de varios segmentos que corresponden a los genes de resistencia y que se han adquirido por transferencia lateral. Esto sugiere un modelo evolutivo en donde cada plásmido pA/C divergió de un ancestro común a través de un proceso específico de integración de estos elementos, uno a la vez (Fricke *et al.*, 2009). Por otro lado, el modelo de dispersión para los pA/C es más complejo. Aunque los plásmidos poseen los genes necesarios para la conjugación desde su ancestro pRA1, Fricke y colaboradores demostraron que el pRA1 tiene la capacidad de auto-transferirse a cepas de *E. coli* con una frecuencia de 10^{-3} , pero que esta propiedad desaparece en los plásmidos pA/C recientes, a medida que incrementa su tamaño (Fricke *et al.*, 2009). Sin embargo, esta característica no es constante en los pA/C recuperados de diferentes hospederos, ya que algunos pueden conjugarse con diferentes frecuencias (entre 10^{-2} a 10^{-7}) y otros no lo pueden hacer (Fricke *et al.*, 2009, Poole *et al.*, 2009, Welch *et al.*, 2007). Mediante los análisis de secuencias de los plásmidos, se postuló que la ausencia de conjugación era resultado de la inserción del gen *bla*_{CMY-2} en una de las regiones involucradas en la conjugación. Poole y colaboradores, evaluaron la capacidad conjugativa de plásmidos pA/C recuperados en *Salmonella enterica* con o sin la presencia del gen *bla*_{CMY-2}, y concluyeron que los plásmidos pA/C con este gen sólo se conjugaban en presencia de otro plásmido con diferente grupo de incompatibilidad, con frecuencias variables de 10^{-2} a 10^{-5} , mientras que los plásmidos pA/C sin este gen fueron conjugativos por sí solos a frecuencias similares (Poole *et al.*, 2009).

1.5.5 Caracterización del gen *bla*_{CMY-2}

Con el fin de conocer la estructura que rodea el gen *bla*_{CMY-2}, y determinar si se encuentra flanqueado por integrones, se secuenciaron las regiones que rodean los plásmidos clasificados inicialmente como tipo A, B, C y D (Carattoli *et al.*, 2002), además de otros plásmidos portadores de *bla*_{CMY-2} recuperados en Taiwán (Kang *et al.*, 2006). Como resultado, se observó que los genes que rodean al *bla*_{CMY-2} se encuentran conservados en los diferentes plásmidos. Los genes corriente

arriba del *bla*_{CMY-2} comparten >96% de identidad con los genes adyacentes a AmpC del cromosoma de *Citrobacter freundii* y el gen corriente abajo es una secuencia de inserción de tipo ISEcp1 (también conocida como TnpA), descrita anteriormente en plásmidos que portan beta-lactamasas tipo CTX-M (Canton & Coque, 2006). Esta secuencia actúa como promotor, aumentando los niveles de expresión de estas enzimas (Canton & Coque, 2006, Giles et al., 2004). Lo que estos resultados indican, es que el gen *bla*_{CMY-2} se está translocando junto con los genes cromosomales adyacentes como un elemento completo o región CMY.

1.5.6 IncX1

Los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncX, se consideran de amplio rango de hospedero y se encuentran altamente diseminados en enterobacterias. El plásmido R6K se reconoce como el arquetipo por ser el primer plásmido identificado de este grupo en *E. coli* en 1970. Posteriormente en la década de los 1990s, se observó que los plásmidos IncX se encontraban presentes en los aislamientos recuperados desde la era pre antibióticos, confirmando que son elementos accesorios del genoma que siempre han estado presentes (Jones & Stanley, 1992). La comparación de los plásmidos encontrados en estos aislamientos versus el R6K, permitió separarlos en dos subgrupos en donde el R6K es el único representante del subgrupo IncX2, mientras que el resto de los plásmidos se clasificaron como subgrupo IncX1. Sin embargo, a pesar de las diferencias en su esqueleto siguen siendo incompatibles entre ellos (Jones *et al.*, 1993).

Se ha documentado recientemente la reaparición de plásmidos del grupo IncX1 en varios enteropatógenos, los cuales además de portar genes de resistencia a antibióticos (Norman *et al.*, 2008), pueden llevar operones que confieren otros tipos de ventajas adaptativas como la formación de biopelículas (Ong *et al.*, 2009, Ong *et al.*, 2008), o en algunos casos confieren ventajas específicas para el huésped como la conversión de fagotipos en el serovar Enteritidis (Brown *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia de estos plásmidos, mostró que los pX1 son elementos altamente conjugativos (con frecuencias de 10^{-3}), de amplio rango de hospederos, con facilidad para adquirir grandes operones de genes y que adicionalmente en su genoma portan varios grupos de genes que le confieren estabilidad, asegurando su permanencia en las poblaciones bacterianas. Es por esta razón que Hansen y colaboradores, escogieron el plásmido X1 como un vector por excelencia y, basándose en los genes conservados de los plásmidos secuenciados hasta la fecha, sintetizaron *de novo* un plásmido llamado pX1.0 que tiene la capacidad de auto-replicarse, conjugarse y mantenerse en la población al igual que los plásmidos de campo, con la ganancia de que el usuario lo puede manipular para agregar o quitar secuencias a su antojo (Hansen *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se ha reportado la co-integración de plásmidos pX1 con el plásmido de virulencia del serovar Dublin (pSDV), generando un nuevo tipo de pSDV con dos orígenes de replicación (Chu et al., 2008). Esta característica de co-integración también se ha observado entre dos plásmidos X1, el R485 y el pOLA52, lo que indica que este tipo de eventos son frecuentes para este grupo (Norman et al., 2008).

1.5.7 Plásmidos de bajo peso molecular en *Salmonella*, el caso de la familia ColE1-like.

Los plásmidos de bajo peso molecular se encuentran frecuentemente en *Enterobacteriaceae*, pero se han estudiado poco. Para *Salmonella*, se ha estimado que sólo el 10% de los aislamientos portan estos plásmidos pequeños y están constituidos por genes que codifican para una amplia variedad de funciones biológicas como, por ejemplo, sistemas de restricción-modificación, genes que codifican para transcriptasas inversas, para antígeno-O y genes de resistencia a antibióticos (Rychlik et al., 2006). De estos, la mayoría pertenecen a la familia ColE1, los cuales son ampliamente utilizados en el campo de la biología molecular como vectores de clonación por su fácil manipulación, tamaño pequeño y gran número de copias. Esta familia se agrupa dentro de los plásmidos movilizables, es decir, que no poseen la maquinaria necesaria para la conjugación, pero sí utilizan la de los plásmidos conjugativos para su exitosa dispersión (Figura 3). Adicionalmente, su gran número de copias permite la segregación a las células hijas asegurando su permanencia. Los plásmidos de alto peso molecular de los grupos IncI1, IncFII e IncF movilizan eficientemente a los plásmidos ColE1, aunque se ha reportado una menor eficiencia de movilización con plásmidos de otros nueve grupos incluyendo el IncA/C e IncX2 (Selvaratnam & Gealt, 1993, Warren et al., 1979). Los plásmidos ColE1 cuentan para su movilización con cuatro genes (*mobA*, *mobB*, *mobC*, *mobD*) los cuales conforman el *relaxosoma*. MobA codifica para la relaxasa, que cumple la misma función que en los plásmidos conjugativos, cortar el ADN en el sitio nick dentro del *oriT*. Se ha planteado que MobE y MobC pueden estar involucradas en el ensamblado del relaxosoma o en dirigir éste hacia el transferosoma (ver siguiente sección), mientras que MobD codifica para una proteína que ejerce exclusión de entrada para otros plásmidos y también juega un papel en transferencia (Yamada et al., 1995).

A pesar de que en *Salmonella* la prevalencia de los plásmidos ColE1 se ha estudiado poco se cuenta con secuencias de algunos de estos plásmidos encontrados en diferentes serovares, los cuales son casi idénticos entre ellos. La única diferencia es la presencia de genes de resistencia. Recientemente, Chen y colaboradores (Chen et al., 2010), demostraron que la presencia de plásmidos ColE1 con resistencia a kanamicina en diferentes serovares de *Salmonella enterica* es más común de lo que se creía, al encontrarlo en 30 aislamientos de 102 analizados. Curiosamente, observaron que el 63% de estos plásmidos coexistían con un plásmido del grupo A/C en el serovar Newport para el cual es predominante (Lindsey et al., 2009), mientras que en *Typhimurium* sólo se observó la presencia del replicón ColE1.

1.6 Conjugación

La conjugación es uno de los tres mecanismos de transferencia lateral utilizados por las bacterias para adquirir material genético foráneo, además de funcionar como un mecanismo alternativo para asegurar la presencia del plásmido en las células hijas que no lo adquirieron en el momento de la división celular.

Este proceso requiere de un contacto célula-célula, conocido como pareja de apareamiento, y está mediado por la formación de un pilus sexual. Se definió desde su descubrimiento como sexo bacteriano y después de cinco décadas de estudio, se tiene una idea

bastante aproximada acerca de cómo funciona el proceso de conjugación y de la naturaleza del poro conjugativo a través del cual pasa el ADN plasmídico. Sin embargo, todavía hay huecos de conocimiento en el proceso de conjugación.

La conjugación es un proceso universalmente conservado en procariotas, ampliamente estudiado en bacterias Gram-negativas y recientemente en bacterias Gram-positivas y arqueas. En bacterias Gram-negativas, la conjugación requiere de tres elementos indispensables de ADN-proteínas, las cuales se codifican en los mismos plásmidos: el *transferosoma* (T4SS) consiste en un sistema de secreción tipo IV, el cual atraviesa la membrana celular bacteriana y se encarga de ensamblar y retraer el pilus, identificar una potencial célula receptora, etiquetar el ADN del plásmido y finalmente transferir una sola hebra por el poro a la célula receptora en dirección 5'-3'. Todo este proceso es conocido como formación del poro conjugativo y solo es posible cuando se ha dado el contacto célula-célula. El *relaxosoma*, es un complejo de núcleo-proteínas involucrado en el procesamiento del ADN y en la entrega de éste al transferosoma. Este complejo contiene la proteína relaxasa, encargada de cortar el ADN en el sitio *nick* del *oriT*, y generar la hebra de cadena sencilla para empezar su transferencia, además de la presencia de proteínas auxiliares que se unen alrededor de esta región y sirven como ayudantes de la relaxasa. El tercer elemento y una de las proteínas más importantes en este proceso, es la *proteína acopladora* (T4CP) la cual conecta el *relaxosoma* al *transferosoma* y se cree que está involucrada también en la formación del poro.

Sin embargo, existen barreras que interfieren con la transferencia y establecimiento del plásmido en la célula receptora. La primera barrera se conoce como la *exclusión de superficie* (SFX) la cual impide la formación de parejas de apareamiento estables. La segunda barrera se conoce como la *exclusión de entrada* (EEX) que, como su nombre lo indica, impide la entrada del ADN plasmídico a través del poro conjugativo, sin importar si ocurrió la formación exitosa de las parejas de apareamiento (Figura 3). Los dos genes que codifican para las proteínas responsables de estas barreras, se encuentran principalmente en plásmidos conjugativos, siendo los más estudiados los genes *traT* y *traS* del plásmido F. En el proceso de conjugación, si tanto la célula donadora como la receptora portan un plásmido tipo F, la presencia de las proteínas TraT y TraS en la membrana externa e interna de la célula receptora, respectivamente, impiden el reconocimiento por parte del pilus de la cepa donadora lo cual no permite el contacto célula-célula, indispensable para iniciar la conjugación. Este fenómeno de exclusión es otra forma de incompatibilidad plasmídica (Figura 3) (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2008).

Una vez que el plásmido entrante ha logrado sobrepasar estas dos barreras, tiene que contender con los sistemas de restricción-modificación (R-M) de cada bacteria, que se definen como el sistema inmune de los procariotas. Este sistema utiliza dos enzimas que realizan funciones diferentes en la célula hospedera: la endonucleasa que reconoce la secuencia foránea de ADN a la cual degrada en su totalidad; y una metiltransferasa que protege al ADN nativo mediante metilación de las adeninas o citosinas, impidiendo su reconocimiento por parte de la endonucleasa y por lo tanto su degradación. Sin embargo, algunos plásmidos y fagos tienen la habilidad de adaptarse a estos sistemas de R-M y así escapar a los procesos de degradación, lo que les permite establecerse y prevalecer en la célula hospedera (Tock & Dryden, 2005).

Cuando todas estas barreras han sido superadas, el ADN plasmídico en la célula receptora debe duplicarse para convertirse en ADN de doble cadena y así retomar su conformación nativa

circular y, lo más importante, ser replicativo y estable para poder segregarse a las siguientes generaciones y de esta forma fijarse en la población (Figura 3) (de la Cruz *et al.*, 2010).

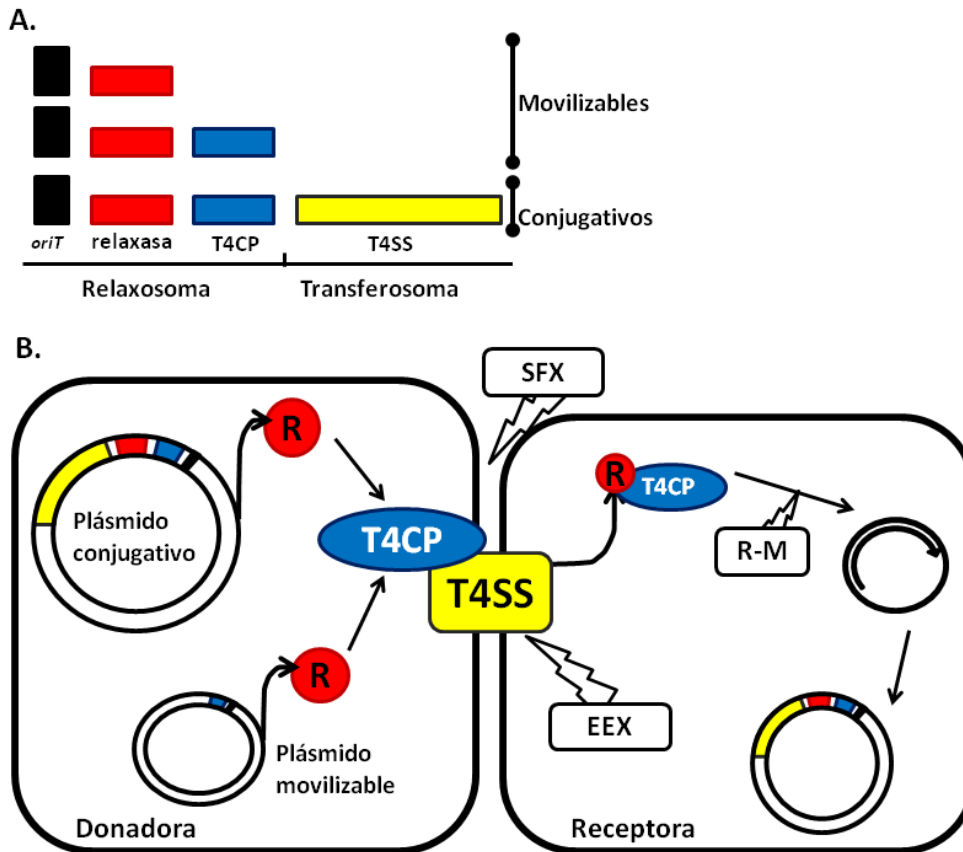


Figura 3. Diagrama de los complejos ADN-proteína involucrados en los principales pasos de la conjugación y movilización de plásmidos en bacterias Gram-negativas, así como diferentes barreras para la conjugación. A. Vista esquemática de la composición genética de plásmidos transferibles. Los plásmidos conjugativos codifican los cuatro módulos importantes: el origen de transferencia *oriT* (en negro), el *relaxosoma* que codifica la relaxasa R (en rojo), la *proteína acopladora* T4CP (en azul) y el *transferosoma* T4SS (en amarillo). Los plásmidos movilizables codifican sus genes MOB que incluyen *oriT* y relaxasa R y adicionalmente pueden codificar o no T4CP, pero necesitan el T4SS de un plásmido conjugativo co-residente para poder ser movilizados. B. Esquema de las principales interacciones y barreras en el proceso de conjugación. Primer paso: la relaxasa corta el ADN en el *oriT*. La hebra de ADN que contiene la relaxasa unida covalentemente a su extremo 5', es desplazada por un proceso de replicación simultaneo del ADN plasmídico. Segundo paso: la relaxasa interactúa con la T4CP y luego con algunos componentes del T4SS, para finalmente ser transportada a la célula receptora. Tercer paso: el complejo ADN plasmídico-relaxasa-T4CP debe traspasar las barreras de *exclusión de superficie* (SFX) y *exclusión de entrada* (EEX). Cuarto paso: el ADN plasmídico entrante sobrevive o se adapta a los sistemas de restricción-modificación (R-M) de la célula hospedera. Quinto paso: superadas las tres barreras anteriores, el plásmido debe comenzar su proceso de duplicación y re-circularización para poder mantenerse en la descendencia. Adaptado de (Frost & Koraimann, 2010, Smillie *et al.*, 2010).

2 Antecedentes: el establecimiento de un programa de vigilancia de enteropatógenos en México.

En México, el grupo de la Dra. Mussaret Zaidi (Zaidi *et al.*, 2006) inició en el año 2000 un programa de vigilancia epidemiológica que incluye cuatro Estados de México: Yucatán, Michoacán, San Luís Potosí y Sonora y cuyo objetivo es conocer cuáles son los enteropatógenos predominantes en la población mexicana y cuáles son los alimentos cárnicos involucrados en su transmisión. Uno de los enteropatógenos principalmente encontrados es *Salmonella*, y el serovar Typhimurium es el que se recupera con mayor frecuencia en las muestras de humanos con diferentes cuadros clínicos (asintomáticos, diarrea y cuadros invasivos que en algunos casos ocasionaron la muerte); así como en las muestras recuperadas de carnes crudas e intestinos de res, cerdo y pollo (Zaidi *et al.*, 2007, Zaidi *et al.*, 2006). Anteriormente, en los aislamientos procedentes del Estado de Yucatán, se confirmó por PFGE la rápida diseminación de un clon de Typhimurium multirresistente (MDR) a más de cinco antibióticos, tanto en alimentos como en humanos, que porta el gen plasmídico de resistencia *bla*_{CMY-2}, el cual confiere resistencia a ceftriaxona (CRO). Este clon es el causante de la mayoría de casos de gastroenteritis y de los cuadros invasivos en los niños en Yucatán (Zaidi *et al.*, 2007).

3 Identificación de los genotipos predominantes en México y su asociación con determinantes de virulencia y resistencia. Primera parte de este estudio.

En la parte inicial de este estudio, se analizaron 114 aislamientos de Typhimurium recuperados en el programa de vigilancia durante el 2000 al 2005, procedentes de los cuatro Estados de México, de los cuales 62 eran de muestras de humanos (incluyendo pacientes asintomáticos, con diarrea y enfermedad sistémica) y los 52 restantes de muestras de carnes crudas e intestinos de res, cerdo y pollo. Estos aislamientos se analizaron por PFGE y MLST y paralelamente se evaluaron algunos genes accesorios de virulencia y resistencia a antibióticos. Se determinó la presencia del plásmido de virulencia (pSTV) característico de este serovar (McClelland *et al.*, 2001), la presencia del gen plasmídico *bla*_{CMY-2} que codifica para la resistencia a CRO (Bauernfeind *et al.*, 1996) y la presencia de integrones que portan genes de resistencia a diferentes antibióticos, incluidos los de la isla genómica característica de *Salmonella* (SGI1) (Boyd *et al.*, 2001).

Nosotros encontramos cuatro genotipos o tipos de secuencia (ST). El ST 19, descrito a nivel internacional, el ST 302 descrito en México y Zimbawe y los nuevos ST 213 y 429, reportados hasta la fecha sólo en México. El ST predominante en los cuatro Estados fue el ST 213, con 63 aislamientos (62%), que se recuperó principalmente en el Estado de Yucatán a partir del 2002; seguido del ST 19 encontrado en 35 aislamientos (34%), mayoritariamente durante los primeros años de la vigilancia, y finalmente el ST 302 que se encontró en sólo 4 de los aislamientos (4%) procedentes de Sonora del 2002 al 2004 (Wiesner *et al.*, 2009). Adicionalmente, observamos que el ST 213 fue estadísticamente más prevalente en las muestras de carnes mientras que el ST 19 fue predominante en las muestras recuperadas de humanos. Además observamos un patrón temporal en el cual el ST 213 está reemplazando al ST 19 ancestral en los cuatro Estados.

La distribución de los genes accesorios no fue aleatoria entre los diferentes genotipos, mostrando fuertes asociaciones: 1) El pSTV se encontró principalmente en el ST 19. 2) El plásmido con el gen *bla*_{CMY-2} (pCMY-2) se encontró exclusivamente en el ST 213. 3) El integrón más abundante IP-1 (*dfrA12-orfF-aadA2*), se descubrió solamente en el ST 213. 4) La isla genómica SGI1 se localizó en un subgrupo del ST 19 que porta el pSTV. Los datos obtenidos por PFGE correlacionaron con los datos mencionados anteriormente y permitió observar divisiones genéticas en nuestra población (Wiesner et al., 2009).

La resistencia a CRO en enteropatógenos es un problema serio de salud pública, ya que es el antibiótico de última elección para el tratamiento de la enfermedad diarreica aguda y de la infección sistémica. En la última década, han sido materia de estudio la aparición y la rápida dispersión de plásmidos que portan genes que codifican para estas resistencias (Welch et al., 2007). Es importante caracterizar estos elementos para conocer sus mecanismos de evolución y de dispersión.

4 El genotipo ST 213 de Salmonella Typhimurium está asociado a dos tipos de plásmidos

IncA/C. Segunda parte de este estudio.

Mediante la aplicación de metodologías como la tipificación de replicones mediante PCR (PCR-replicon Typing) (Carattoli et al., 2005) e hibridaciones, en la segunda parte de este trabajo logramos determinar que el pCMY-2 asociado al ST 213 en nuestra población, pertenece al grupo de incompatibilidad IncA/C (pA/C). Los aislamientos ST 213 sensibles a CRO también portan plásmidos pA/C. Como resultado de la caracterización de estos plásmidos mediante patrones de restricción y amplificación de siete genes conservados en el esqueleto, observamos que, aunque por secuencia son 100% idénticos al plásmido de referencia pSN254 recuperado en *Salmonella* Newport (Welch et al., 2007), nuestra población pA/C está conformada por dos tipos. El tipo I (pA/C CMY+) se caracteriza por la presencia de la región CMY, mientras que el tipo II (pA/C CMY-) carece de la región CMY y de cuatro de los otros marcadores estudiados (Wiesner et al., 2011). El análisis de la región CMY en los plásmidos pA/C CMY+, mostró una región altamente conservada de 13 Kb, insertada entre los genes *traV-traC* del esqueleto del plásmido. Adicionalmente, ésta región presentó sintenia con algunos plásmidos A/C secuenciados de referencia (Fricke et al., 2009). El mapeo de la región CMY en los pA/C CMY+, mostró que está compuesta por la secuencia de inserción *ISEcp1*, seguida por el gen *bla*_{CMY-2} y tres genes conservados que son homólogos a los genes adyacentes *AmpC* de *C. freundii*. El resto de la región está compuesta por genes del esqueleto del pA/C que se encuentran en otros plásmidos secuenciados (Wiesner et al., 2011). Adicionalmente, probamos la capacidad conjugativa de 17 pA/C, con o sin CMY. La única cepa positiva para conjugación fue la YUHS 05-78 (YU39), que tiene un plásmido pA/C CMY+, aunque a muy bajas frecuencias (10^{-7} a 10^{-9}).

Todos los resultados de la primera y de la segunda parte de este estudio, se muestran en detalle en las dos publicaciones adjuntas al final de esta sección.

4.1 Adaptación a hospederos

Salmonella Typhimurium se considera como un serovar de amplio rango de hospedero, ya que causa enfermedad en numerosas especies incluidos humanos, el ganado, las aves de corral, los roedores y las aves silvestres. Sin embargo, se han descrito para este serovar genotipos que están altamente adaptados a un hospedero específico. Estos se consideran de limitado rango de hospedero, como los que se encuentran únicamente en las aves silvestres o en los patos (Rabsch *et al.*, 2002a, Rabsch *et al.*, 2002b). Por otro lado, los genotipos asociados con animales de granja se consideran de amplio rango de hospedero, porque tienen la capacidad de circular entre varias especies de mamíferos, pero curiosamente no circulan en las aves (Rabsch *et al.*, 2002a). El grado de adaptación de cada genotipo a su hospedero implica diferencias en su capacidad de virulencia. Se ha propuesto que cuando un patógeno llega a un nuevo hospedero causa altos porcentajes de mortalidad, debido a que no se encuentra bien adaptado. Como consecuencia, la muerte del hospedero destruye su hábitat, y reduce tanto su capacidad de transmisión como su descendencia. De acuerdo a esta teoría, estos patógenos con el tiempo evolucionan en formas menos virulentas, que se reflejará en una mejor adaptación al hospedero al no matarlo (Baumler *et al.*, 1998).

Las asociaciones observadas en la población analizada de Typhimurium en México sugieren que el ST 19 es un genotipo más adaptado al hospedero humano, mientras el ST 213 está mejor adaptado a los animales (Wiesner *et al.*, 2009). Tomando en cuenta la relación bacteria-hospedero, es muy probable que cuando el ST 213 entra en contacto con el humano a través de la cadena alimenticia por un inadecuado manejo de las carnes en los rastros, genere algunos cuadros de infección sistémica por este cambio de hospedero, como lo pudimos observar en algunos casos de nuestra población de estudio (Wiesner *et al.*, 2009). Por otro lado, si consideramos que el ST 19 es un genotipo más adaptado a los humanos, cuando se cambia de hospedero y se inocula en otra especie animal (como por ejemplo en el ratón) genera cuadros invasivos que conllevan a la muerte del animal (Gulig & Curtiss, 1987).

A la fecha, el papel exacto del pSTV en virulencia no es totalmente claro. Sin embargo este plásmido, que es un elemento accesorio de Typhimurium, se ha estudiado debido a su papel en la virulencia para el modelo del ratón, en el cual asemeja la infección causada por Typhi en humanos. Los estudios acerca de la función de este plásmido y específicamente del operón *spv*, han demostrado que la presencia del pSTV incrementa la tasa de crecimiento celular bacteriana dentro de macrófagos de ratón en las primeras semanas de la infección sistémica y finalmente llevan a la muerte del animal (Gulig *et al.*, 1993, Gulig *et al.*, 1998). Cepas curadas del pSTV muestran atenuación de la virulencia en el ratón, por lo que se afirma que este plásmido es necesario para los procesos de invasión y de ahí su nombre de plásmido de virulencia.

Sin embargo, esta afirmación no es absoluta con respecto a su papel en la bacteremia (infección sistémica) en humanos. Para tratar de relacionar al pSTV con la bacteremia en humanos, se han analizado cepas de Typhimurium recuperadas de pacientes con gastroenteritis (materia fecal) y enfermedad sistémica (sangre) y se ha evaluado la presencia del pSTV. Los resultados son controversiales al respecto: Chiu y colaboradores., indican que este plásmido no está asociado en particular con ninguno de los dos cuadros (Chiu *et al.*, 2000, Chiu *et al.*, 1999), mientras que Fierer,

J. y Guiney, D.G. afirman que la presencia de este plásmido no es importante en los cuadros de gastroenteritis pero que sí contribuye en la infección sistémica (Fierer *et al.*, 1992, Guiney & Fierer, 2011). Las desventajas de estos estudios es que se realizan sobre muestras epidemiológicas recuperadas de humanos y están sesgadas por la población analizada o por las muestras disponibles. En nuestro estudio, analizamos muestras recuperadas tanto de humanos como de animales y encontramos que el pSTV si se encuentra significativamente asociado a los humanos, aunque no en los casos de infección sistémica, por lo que nuestros resultados apoyan la hipótesis de que no es necesario para causar bacteremia en humanos.

Por otro lado, las cepas ST 213 no portan el pSTV, como ya se ha reportado en otros genotipos de *Typhimurium* (Olsen et al., 2004). El genotipo ST 213 se encontró estadísticamente asociado a animales aunque se recuperó también de humanos. Dentro de nuestra población de estudio, se recuperó este genotipo en cinco muestras de infección sistémica en niños. Estas cepas están fuertemente atenuadas en su virulencia hacia el ratón (Wiesner y Bustamante, datos no publicados). Estos resultados en conjunto, siguen apoyando la hipótesis de que el pSTV es necesario para la virulencia en el ratón pero no para causar bacteremia en humanos. Esto es congruente con la hipótesis de que las cepas ST 213 se han adaptado a hospedarse en los animales de granja, lo cual se refleja en el hecho de que no son virulentas en el ratón.

El ST 213 porta el pA/C. Es probable que la ausencia de pSTV facilite la adquisición del pA/C, el cual confiere resistencia a once antibióticos diferentes, lo que es una ventaja adaptativa, pero desconocemos si en este plásmido se encuentran determinantes de patogenicidad. Si estas cepas se están seleccionando continuamente en la producción de carnes por los antibióticos suministrados a los animales en las granjas, entonces se favorece su transmisión al humano, en el cual puede causar cuadros de enfermedad sistémica, convirtiéndose en un patógeno difícil de erradicar debido a su multiresistencia (Wiesner et al., 2011, Zaidi et al., 2007). Es importante resaltar que en nuestra población de *Typhimurium* no encontramos una cepa que portara los dos plásmidos, resultado que llamó nuestra atención desde un inicio. Nosotros creemos que la presencia de los plásmidos pA/C y pSTV en estos genotipos, podría tener un papel relevante en la adaptación al hospedero anteriormente mencionada. Pero primero, teniendo en cuenta la asociación específica entre el ST 19 con el pSTV y entre el ST 213 con el pA/C, debemos evaluar la relación entre plásmido-genotipo para que posteriormente se pueda evaluar la relación genotipo-hospedero. Es por esto que inicialmente decidimos evaluar si el ST 19 y el ST 213 podían adquirir y mantener los dos plásmidos y si éstos podían auto-transferirse entre los genotipos.

5 Artículos.

- 5.1 Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains.**

Research article

Open Access

Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains

Magdalena Wiesner¹, Mussaret B Zaidi², Edmundo Calva¹,
Marcos Fernández-Mora¹, Juan J Calva³ and Claudia Silva*¹

Address: ¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, ²Laboratorio de Investigación, Hospital General O'Horan, Mérida, México and ³Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán", México City, México

Email: Magdalena Wiesner - mawire@ibt.unam.mx; Mussaret B Zaidi - mbzaidi@prodigy.net.mx; Edmundo Calva - ecalva@ibt.unam.mx; Marcos Fernández-Mora - marcos@ibt.unam.mx; Juan J Calva - juanjcalva@gmail.com; Claudia Silva* - csilvamex1@yahoo.com

* Corresponding author

Published: 3 July 2009

Received: 18 November 2008

BMC Microbiology 2009, 9:131 doi:10.1186/1471-2180-9-131

Accepted: 3 July 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/131>

© 2009 Wiesner et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Bacterial genomes are mosaic structures composed of genes present in every strain of the same species (core genome), and genes present in some but not all strains of a species (accessory genome). The aim of this study was to compare the genetic diversity of core and accessory genes of a *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (Typhimurium) population isolated from food-animal and human sources in four regions of Mexico. Multilocus sequence typing (MLST) and macrorestriction fingerprints by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used to address the core genetic variation, and genes involved in pathogenesis and antibiotic resistance were selected to evaluate the accessory genome.

Results: We found a low genetic diversity for both housekeeping and accessory genes. Sequence type 19 (ST19) was supported as the founder genotype of STs 213, 302 and 429. We found a temporal pattern in which the derived ST213 is replacing the founder ST19 in the four geographic regions analyzed and a geographic trend in the number of resistance determinants. The distribution of the accessory genes was not random among chromosomal genotypes. We detected strong associations among the different accessory genes and the multilocus chromosomal genotypes (STs). First, the *Salmonella* virulence plasmid (pSTV) was found mostly in ST19 isolates. Second, the plasmid-borne beta-lactamase *cmv-2* was found only in ST213 isolates. Third, the most abundant integron, IP-1 (*dfiA12*, *orfF* and *aadA2*), was found only in ST213 isolates. Fourth, the *Salmonella* genomic island (SGI1) was found mainly in a subgroup of ST19 isolates carrying pSTV. The mapping of accessory genes and multilocus genotypes on the dendrogram derived from macrorestriction fingerprints allowed the establishment of genetic subgroups within the population.

Conclusion: Despite the low levels of genetic diversity of core and accessory genes, the non-random distribution of the accessory genes across chromosomal backgrounds allowed us to discover genetic subgroups within the population. This study provides information about the importance of the accessory genome in generating genetic variability within a bacterial population.

Background

Bacterial genomes are mosaic structures composed of genes present in every strain of the same species (core genome), and genes present in some but not all isolates of a species (accessory genome) [1-3]. Genomic and population studies have shown that core and accessory genes often display distinct evolutionary histories, mainly due to the differential degree of mobility and selective pressures to which each category is subjected. It is accepted that the evolutionary histories of accessory genes are more complex than those of housekeeping genes [3,4]. Therefore, it is desirable to study core and accessory genes to better understand the population structure of a bacterial species [3,5].

Salmonella enterica is considered by population geneticists as the paradigm of a clonal bacterial species, that displays low levels of recombination and has mainly evolved by point mutations [6-8]. *Salmonella enterica* is subdivided in seven subspecies, the strains responsible for almost all the *Salmonella* infections in humans and warm-blooded animals belong to subspecies *enterica*. *Salmonella enterica* subspecies *enterica* has more than 1,500 described serovars [9]. To discriminate clones within serovars, macrorestriction analysis by pulsed-field electrophoresis (PFGE) and phage-typing are frequently used as subtyping techniques. More recently, multilocus sequence typing (MLST) has become an important tool for the study of *Salmonella* strains [10-13].

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Typhimurium (Typhimurium) is considered a broad host range serovar, usually associated with gastroenteritis in a broad range of phylogenetically unrelated host species [14-16]. The aim of this study was to compare the genetic diversity of core and accessory genes of a set of Typhimurium isolates sampled from food-animal and human sources in four geographic regions of Mexico. MLST and macrorestriction PFGE fingerprints were used to address the core genetic variation. To evaluate the distribution and genetic variation of the accessory genome, genes involved in pathogenesis and antibiotic resistance were selected. Schematic representations of the molecular markers assessed in this study are presented in Figures 1 and 2, and a brief description of them is presented below.

MLST is based on allelic differences in the nucleotide sequences of housekeeping genes among bacterial strains of a given species (Figure 1A) [5,17]. Macrorestriction analysis uses endonucleases that cut DNA at rare restriction sites, generating large fragments that are resolved by PFGE (Figure 1A). This methodology exhibits mostly chromosomal variation, but large plasmids can also be observed within the fingerprint [18].

For the accessory genome, we determined the presence of the Typhimurium virulence plasmid (pSTV). This plasmid has been extensively studied in regard to its role in invasiveness in the murine model [19-23]; its importance in human systemic infections is still controversial [24-27]. Three genetic markers were used to determine the presence of pSTV: *spvC*, *rck* and *traT*, that are genes involved in resistance to serum and survival in macrophages (Figure 1B) [19,28].

The antibiotic resistance determinants studied were those contained in integrons, and the presence of the plasmid-borne *cmv-2* gene (Figure 1C), conferring resistance to extended spectrum cephalosporins. The *cmv-2* gene is of major public health relevance since it confers resistance to ceftriaxone, the drug of choice for treatment of children with invasive *Salmonella* infections. In a previous study, we reported the rapid dissemination of this resistance in Typhimurium from Yucatán, Mexico, and its association with systemic infections in children [29]. Most *cmv-2* genes have been located in large plasmids (> 100 kb), and were not found as an integron-born cassette [30,31].

The integron is a recombination and expression system that captures genes as part of a genetic element called a gene cassette (Figure 2A). Class 1 integrons are found extensively in clinical isolates, and most of the known antibiotic resistance gene cassettes belong to this class [32-35]. They are frequently located on plasmids and transposons, which further enhances the spread of the gene cassettes [32].

Class 1 integrons have been detected in different *Salmonella* serovars in many countries [36-41]. Among the most studied cases are the chromosomally located integrons present in the so-called *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) (Figure 2B). SGI1 is a 43 kb integrative-mobilizable chromosomal element on which antibiotic resistance genes are clustered, flanked by two class 1 integrons [42,43]. The first cassette carries the *aadA2* gene, which confers resistance to streptomycin and spectinomycin, and the second cassette contains *pse-1*, which confers resistance to ampicillin. In between them are *floR*, *tetR* and *tetG* genes, conferring resistance to chloramphenicol-florfenicol and tetracycline. A cryptic retrorhage element is found as the last element of SGI1 in Typhimurium strains [43,44].

In the present work, analysis of the whole set of genetic markers targeting both housekeeping and accessory genes allowed us to determine genetic subgroups within the Mexican Typhimurium population.

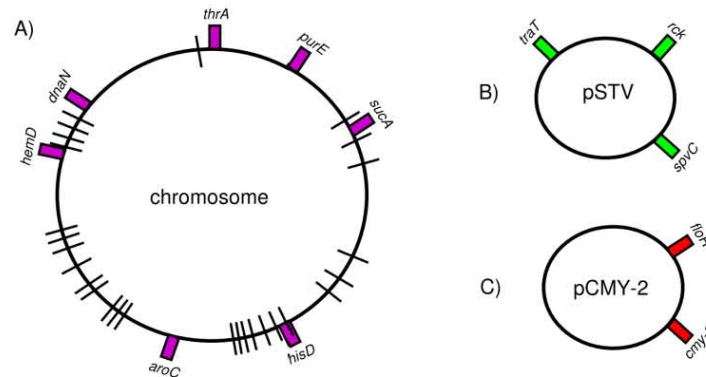


Figure 1
Schematic representation of the molecular markers used to study core and plasmid accessory genes of Typhimurium from Mexico. A) The chromosomal variation was addressed by multilocus sequence typing using partial sequences of the seven housekeeping genes [53], denoted by boxes on the chromosome of strain LT2 [GenBank:AE006468] [46], and by macrorestriction analysis using the rarely cutting enzyme *Xba*I resolved by pulsed-field electrophoresis, represented by lines crossing the chromosome at several points. B) The presence of the Typhimurium virulence plasmid (pSTV) [GenBank:AE006471] was determined by PCR amplification of three genes involved in virulence *spvC*, *rck* and *traT* [19,28], and by Southern hybridisation on plasmid profiles using *spvC* as probe. C) The presence of the plasmid-borne *cmv-2* gene, conferring resistance to extended spectrum cephalosporins [GenBank:NC_011079] [30,31], was determined by PCR and by Southern hybridisation on plasmid profiles. The chloramphenicol determinant *floR* was also assessed, since it has been reported that both resistances are often encoded by the same plasmid [48].

Results

Distribution, genetic relatedness and antimicrobial resistance of MLST genotypes

The multilocus genotype for 114 Typhimurium isolates sampled from food-animal and human sources in four regions of Mexico, was determined. The seven-locus scheme recommended in the *Salmonella* MLST database [45] was applied to 66 isolates, in order to compare the diversity of our isolates with those reported in the database. The partial sequences of seven housekeeping genes revealed a low level of genetic variation; among the 3,336 nt only four substitutions were detected, yielding four multilocus genotypes or sequence types (ST) (Table 1). Thus, three novel alleles were identified: *purE*70, which consisted of a synonymous substitution, *purE*110, which contained one synonymous and one non-synonymous substitution, as compared with the *purE*5 allele present in most of the Typhimurium strains reported; and *sucA*144 which consisted of a synonymous substitution, as compared with the predominant *sucA*9 allele. ST19 is the predominant Typhimurium genotype in the MLST database (227 out of 391 Typhimurium entries) and has a worldwide distribution (24 countries, representing all continents). STs 213 and 429 have been reported only in Mexico, while ST302 has been reported in Mexico and Zimbabwe [45]. Despite the limitations of an analysis

based on only four substitutions, an eBURST analysis of clonal relatedness among the different STs was consistent with the notion of ST19 as the founder genotype of the clonal complex, with the other three STs linked to ST19 as single-locus variants [see Additional file 1]. For the remaining 48 isolates we applied a three-gene scheme (see Methods) that allowed us to discriminate among STs (Table 1). The most abundant genotypes, ST213 and ST19, were found in the four geographic regions and in almost all the sampled years (Table 1). These genotypes presented a differential distribution among the sources of isolation (Table 2). Interestingly, ST213 was more prevalent in food-animals than in humans, where ST19 was predominant (59% vs 27%; $p = 0.001$, OR = 3.9).

We found a temporal pattern in which the derived ST213 is replacing the founder ST19 in the four geographic regions (Figure 3). ST19 was predominant in Yucatán and San Luis Potosí in the first period (2000–2001). During the second period (2002–2003), ST213 was the most abundant genotype in Yucatán, Michoacán and San Luis Potosí; only in Sonora ST19 was the most abundant genotype. However, by the end of the time period studied (2004–2005), ST213 was the predominant genotype in all four states (Figure 3).

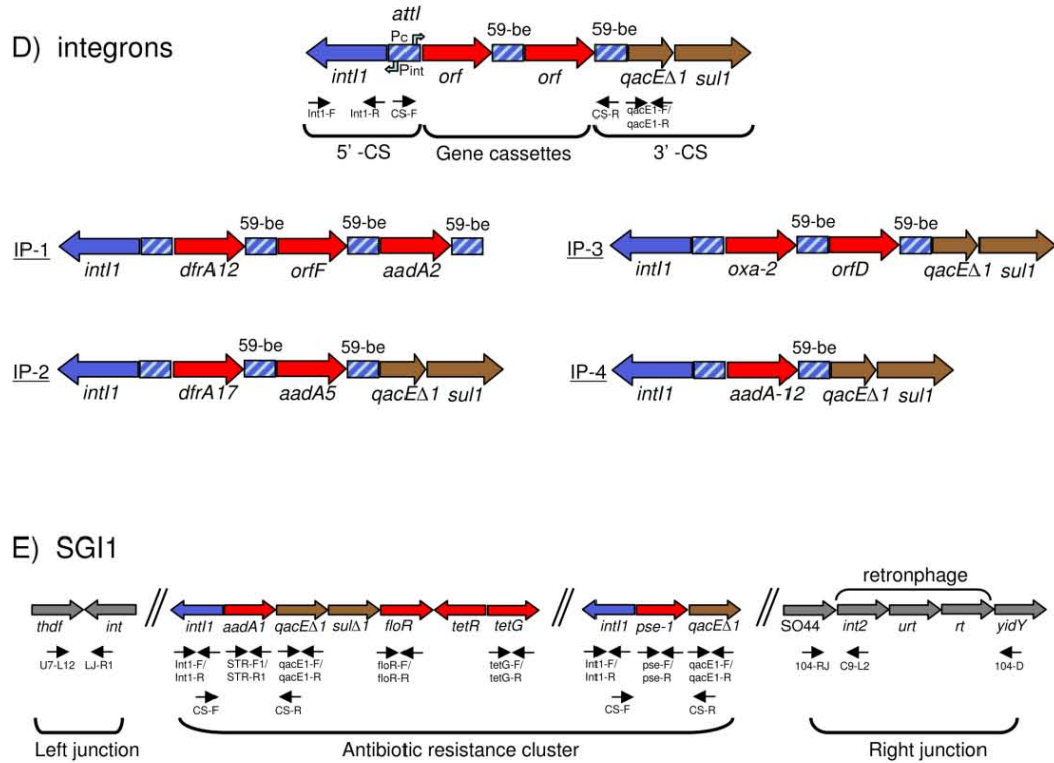


Figure 2
Schematic representation of the molecular markers used to study the integrons of Typhimurium from Mexico.
 A) Diagrammatic representation of the basic features of a class I integron [68]. The positions of the primers [see Additional file 3] used to amplify the different regions are shown by arrows. A class I integron consists of two conserved segments (5'-CS and 3'-CS) separated by a variable region that may contain an array of one or more gene cassettes. The 5'-CS includes the gene for the integrase (*intI1*), the promoters for the expression of the integrase (*P_{int}*) and the gene cassettes (*P_C*), and an adjacent *attI* recombination site, where the cassettes are integrated. Gene cassettes consist of a single promoter-less gene and a recombination site known as a 59-base element (59-be or *attC*), which is recognized by the site-specific recombinase (*intI1*). The 3'-CS includes *qacEΔ1* and *sul1* genes, determining resistance to quaternary ammonium compounds and to sulphonamide, respectively. The structure of the integron profiles found here, IP-1, IP-2, IP-3 and IP-4, are shown with their corresponding gene cassettes. B) Diagram of the regions of the *Salmonella* genome island I (SGI1) [43,44] that were studied. The positions of the primers [see Additional file 3] used to amplify the different regions are shown by arrows. The insertion of the island in the chromosome was detected by amplification of the right and left junctions; from the antibiotic resistance cluster the two integron-born gene cassettes (*aadA2* and *pse-1*), *floR* and *tetG* were amplified.

We found a strong association between STs and antimicrobial resistance. ST213 isolates presented higher percentages of resistance (> 50%) than ST19 isolates, the only exception was ciprofloxacin for which all the isolates were susceptible (Table 3). All the isolates resistant to ceftriaxone belonged to ST213, while all the isolates from STs 19, 302 and 429 were ceftriaxone susceptible. The group of isolates resistant to ceftriaxone (n = 36) was associated

with very high percentages (> 95%) of resistance to ampicillin, chloramphenicol, sulfisoxazole, streptomycin and tetracycline, here after referred to as the pentaresistant phenotype.

The resistance patterns varied across geographic locations. Yucatán was the state with the higher level of multidrug resistance, with an average of seven resistances per isolate;

Table 1: Allelic profiles and sequence types (STs) assigned in the *Salmonella* MLST database for the Mexican Typhimurium strains.

ST	Multilocus allelic profile ^a							No of isolates ^b			States ^c	Years
	<i>aroC</i>	<i>dnaN</i>	<i>hemD</i>	<i>hisD</i>	<i>purE</i>	<i>sucA</i>	<i>thrA</i>	Seven ^b	Three ^b	Total		
19	10	7	12	9	5	9	2	24	17	41	YU, MI, SL, SO	2000–2005
213 ^d	10	7	12	9	70 ^d	9	2	37	31	68	YU, MI, SL, SO	2001–2005
302 ^d	10	7	12	9	110 ^d	9	2	4	0	4	SO	2002–2004
429 ^d	10	7	12	9	5	144 ^d	2	1	0	1	MI	2003

^a Allele and ST numbers were those assigned in the *Salmonella* MLST database [45].

^b Number of strains analyzed using the seven-locus or the three-locus scheme (see methods for details).

^c YU, Yucatán; MI, Michoacán; SL, San Luis Potosí; SO, Sonora.

^d Novel alleles and sequence types (ST) obtained in this work study.

while Sonora presented the lowest levels of resistance with an average of four. Michoacán and San Luis presented intermediate values, both with an average of six. Furthermore, the ST213 ceftriaxone resistant isolates displayed a differential geographic pattern, ranging from 97% of the ST213 isolates in Yucatán to 0% in Sonora, with intermediate levels in Michoacán and San Luis Potosí (Figure 3).

Distribution and associations of pCMY-2

Isolates resistant to ceftriaxone were subjected to PCR analysis to detect the presence of the *bla*_{CMY-2} gene (Figure 1C). All 36 isolates resistant to ceftriaxone were positive, whereas the 12 sensitive isolates tested were negative [see Additional file 2]. Sequencing (564 bp) of *cmv-2* for 16 isolates revealed that all carried an identical allele, suggesting a common origin. The BLAST searches showed that this allele was identical to most of the 100 hits targeting the Enterobacteriaceae (*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* and *Citrobacter*).

To determine the location of the *cmv-2* gene, plasmid profiles for 25 isolates were hybridized with the corresponding radioactive probe. In all the isolates positive for *cmv-2* the probe hybridized with a plasmid of about 200 kb, hereafter referred to as pCMY-2; while the negative isolates did not yield a signal. The strength of the association between pCMY-2 and chromosomal genotype was confirmed ($p = 0.001$, OR = 93), since all the isolates harbouring pCMY-2 were ST213 (Table 3 and Additional file 2).

Table 2: Distribution of human and animal strains of STs 19 and 213 harbouring pSTV or pCMY-2.

Source	Number of strains (%)			
	ST19	ST213	pSTV	pCMY-2
Human	30 (73)	28 (41)	25 (76)	23 (64)
Animal	11 (27)	40 (59)	8 (24)	13 (36)
Total	41	68	33	36

Distribution, genetic diversity and associations of pSTV

The presence of pSTV was first assessed by PCR amplification of *spvC*. Only 30% of the isolates were positive for *spvC* [see Additional file 2]. To confirm the presence or absence of the pSTV we amplified *rck* and *traT* for all 33 *spvC* positive isolates, and for 19 *spvC* negative isolates. All *spvC* positive isolates amplified *traT* and *rck*, with the exception of two isolates that did not amplify *rck* (slhs02–20 and slres03–40; see Additional file 2); while the *spvC* negative isolates did not produce amplifications with either *rck* or *traT*.

To evaluate the genetic diversity of pSTV we determined the nucleotide sequences of *spvC* for 16 representative isolates [see Additional file 2]. All *spvC* sequences (513 bp) were identical to each other, displaying only one nucleotide substitution with respect to the sequence of strain LT2 [GenBank:AE006471] [46]. We further determined the sequences of *traT* and *rck* for 11 and 9 isolates, respectively. The *traT* (450 bp) and *rck* (429 bp) sequences were also identical to each other and to the sequence of strain LT2. These results show pSTV with a low level of genetic diversity distributed in the four geographic regions and recovered during the five sampled years.

We confirmed the presence of pSTV and determined its approximate size by Southern blot hybridization of plasmid profiles for 10 isolates. All the isolates that were positive for the amplification of *spvC*, *rck* and *traT* hybridized with a plasmid of the same size of that of the pSTV of strain LT2 (about 94 kb) [46], and all the negative controls produced no signal with the *spvC* probe. However, one of the isolates that did not amplify *rck* hybridized with a larger plasmid of about 120 kb, indicating that this pSTV is different, probably due to the insertion of mobile elements, such as transposons, as previously reported [19,47].

pSTV was present in 29 ST19 isolates (68%), the four ST302 isolates (100%) and only one ST213 isolate (1%; yuhs03–80; Figure 4 and Additional file 2). This finding

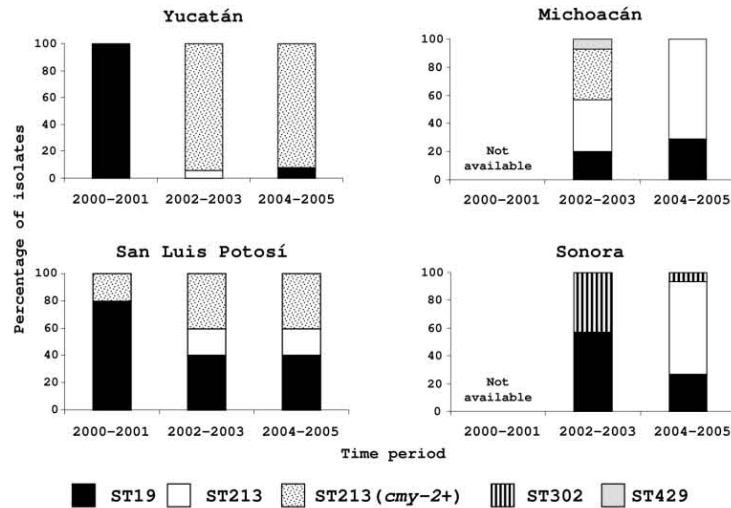


Figure 3
Distribution of the percentage of Typhimurium STs according to the time period and geographic location.

indicates that pSTV was not randomly distributed among isolates, since 60% of the isolates were ST213, and showed a significant association between ST19, and pSTV ($p = 0.001$, $OR = 144$). Human isolates harboured pSTV significantly more than food-animal isolates (43% vs. 16%, $p = 0.002$, $OR = 4.1$), demonstrating a significant association with the human host. Many of these isolates were isolated from humans with diarrhea or asymptomatic infection; only one of the six isolates from systemic infections had pSTV [see Additional file 2], indicating that its presence does not necessarily cause extra-intestinal infections.

Detection and associations of integrons

All 114 isolates were assessed for the presence of integrons using primers targeting the CS regions (Figure 2 and Additional file 3), which amplify the cassettes inserted in inte-

grons. A high proportion (66%) of the isolates produced an amplification product [see Additional file 2]. The most abundant one (42% of the isolates) was of about 2,000 bp, and was designated as integron profile 1 (IP-1). The nucleotide sequence of this integron for 12 isolates showed that it was composed of an array of three cassettes containing the genes *dfrA12*, *orfF* and *aadA2* (Figure 2A). The sequences (1,816 bp) were almost identical to each other (only one substitution) and to most of the sequences retrieved after BLAST searches from GenBank (see details in the Discussion section). An integron of about 1,650 bp was present in six isolates and designated as integron profile 2 (IP-2) (Figure 2A). Nucleotide sequencing showed that it was composed of two cassettes containing the genes *dfrA17* and *aadA5*. The sequences (1,573 bp) of the six isolates were identical to each other and to most of the GenBank sequences (see details in the

Table 3: Percentage of antimicrobial resistant strains for the two main Typhimurium STs.

	Antimicrobial resistance										
	AMP ^a	CHL	SSS	STR	TET	GM	KM	NAL	SXT	CIP ^b	CRO
ST19	61	51	75	80	75	7	10	10	22	0	0
ST213(<i>cmv-2</i>) ^c	68 (97)	90 (94)	98 (97)	97 (97)	97 (100)	59 (55)	37 (33)	72 (61)	82 (92)	0	53 (100)

^a AMP:ampicillin, CHL: chloramphenicol, SSS: sulfisoxazole, STR: streptomycin, TET: tetracycline, GM: gentamicin, KM: kanamycin, NAL: nalidixic acid, SXT: timethoprim-sulfametoxazole, CIP: ciprofloxacin, CRO: ceftriaxone.

^b All the strain were sensitive to CIP according with CLSI [78], including twelve strains with low-level resistance [see Additional file 2].

^c The number in parenthesis is the percentage corresponding to ST213 strains positive for *cmv-2*.

Discussion section). Two isolates produced amplification bands of about 1,300 and 1,000 bp; sequence determination showed that they harboured *oxa-2* and *orfD*, and *aadA12* cassettes, and were designated as IP-3 and IP-4, respectively (Figure 2A and Additional file 2). BLAST searches showed that the sequence of IP-3 (*oxa-2* and *orfD*) was identical to an integron of *Aeromonas hydrophila* from Taiwan [GenBank:DQ519078], and the sequence of IP-4 (*aadA12*) was identical to an integron of *Yersinia enterocolitica* from Spain [GenBank:AY940491] (Figure 2A).

The second most abundant integron profile (16% of the isolates) was conformed by two amplification bands of about 1,000 and 1,200 bp. This is typically the profile recovered from the SG11, and therefore was designated as IP-SG11 (Figure 2B and Additional file 2). Sequence determination for three isolates showed that the 1,000 bp cassette contained *aadA2* and that the 1,200 bp cassette coded for *pse-1*, which are the most commonly found integrons in the SG11. All the isolates were positive for the amplification of *pse-1* and *aadA2* using primers specific for these genes (Figure 2B and Additional file 3). To confirm the insertion of the complete SG11 in the chromosome, we performed PCR assays to amplify the left and right junctions. All the isolates (n = 19) harbouring the IP-SG11 amplified the left junction, the right junction, and were positive for the amplification of the cryptic retronphage on the right junction [see Additional file 2]. Isolates harbouring other integrons did not amplify any of the junctions of the SG11. To further characterize the SG11, we amplified the *tetG* and *floR* genes that are in between the two integrons. Only the isolates harbouring the IP-SG11 produced strong amplification products with *tetG*, and all were positive for *floR*; however, other chloramfenicol resistant isolates also amplified *floR*. All the *cmv-2* positive isolates (n = 36) were positive for *floR*, which is in agreement with the report by Doublet et al. (2004) that both resistances are often found in the same plasmid [11,48]. Thus, most of the *floR* positive isolates harboured SG11 or pCMY-2, however, other chloramfenicol resistant isolates were positive for *floR*. Some of the isolates harbouring IP-2 showed weak amplification bands with *tetG* or *floR* primers, probably due to the presence of related but divergent genes conferring resistance to tetracycline and chloramfenicol [see Additional file 2]. Two significant associations among integrons and the other molecular markers are worthy of mention. First, all IP-1 were carried by ST213 isolates (p = 0.001, OR = 211), either *cmv-2* positive or negative. Second, all the isolates with SG11 were ST19 and carried pSTV (p = 0.001, OR = 119), the only exception was one isolate that did not carry pSTV (yuhs00-141; Figure 4 and Additional file 2).

To determine the location of the integrons, we performed Southern hybridization experiments using fragments of

the *intI1* and *aadA2* genes as probes on the plasmid profiles of eight representative isolates. Three of the five isolates harboring IP-1 hybridized with a plasmid of about 100 kb, the remaining two IP-1 isolates hybridized with a plasmid of about 150 kb. The isolate harboring IP-2 hybridized with a plasmid of about 150 kb, IP-3 with a plasmid of about 35 kb, and IP-4 with a plasmid of about 100 kb.

Detection of *intI1* and *qacEΔ1*

To further characterize the 5' and 3' CSs of integrons we amplified *intI1* and *qacEΔ1* (Figure 2A). All isolates displaying IP-2, IP-SG11, IP-3 and IP-4 showed strong amplification bands for *intI1* and *qacEΔ1*, which indicates that they have 5' and 3' CSs typical of class1 integrons. All the isolates with IP-1 amplified a strong band with *intI1*, but only four isolates amplified strong bands for *qacEΔ1*. Most of the isolates with IP-1 (76%) did not amplify *qacEΔ1* or produced very weak bands (16%) [see Additional file 2]. This result suggests that most of these integrons contain an unusual 3' CS, as recently reported for this integron in *Salmonella* and *Staphylococcus* [40,49-51]. Twenty isolates that did not amplify the cassette region using the CS-F and CS-R primers were selected to test the amplification of *intI1* and *qacEΔ1*. Most of these isolates did not produce amplifications, or produced very weak bands; only four isolates presented an intense *intI1* band.

Macro-restriction PFGE dendrogram and association among molecular markers

The PFGE fingerprints were clustered using the UPGMA algorithm. The dendrogram was divided in five clusters using a cut-off value of 78% similarity (Figure 4). Cluster I grouped all the ST213 isolates and four ST19 isolates. Using the information provided by the accessory genes, this cluster can be further subdivided in four main groups. Group Ia contained only ST213 isolates from three different states, many of which carried *cmv-2* and IP-1. Groups Ib and Ic contained ST213 isolates mostly without *cmv-2* and ST19 isolates without pSTV, and comprising five of the six IP-2. Group Id was similar to group Ia; it contained ST213 isolates, most of which harboured *cmv-2* and IP-1. It is distinguished from groups Ia and Ib by the lack of a large restriction fragment of about 665 kb. Cluster II was formed by ST19 isolates carrying both pSTV and SG11. Clusters III and IV grouped ST19 isolates and the four ST302 strains, most of them carrying pSTV. Cluster IV contained the two ST19 isolates for which *rck* could not be amplified, and one of them carried the IP-4 integron. Finally, cluster V was composed by ST19 strains lacking pSTV. A few exceptions to these general patterns were detected, such as a cluster I ST213 isolate harbouring pSTV (yuhs03-80) or a ST19 isolate harbouring pSTV and SG11 in cluster I (sorapus02-4). The whole set of genetic markers targeting both housekeeping and accessory genes

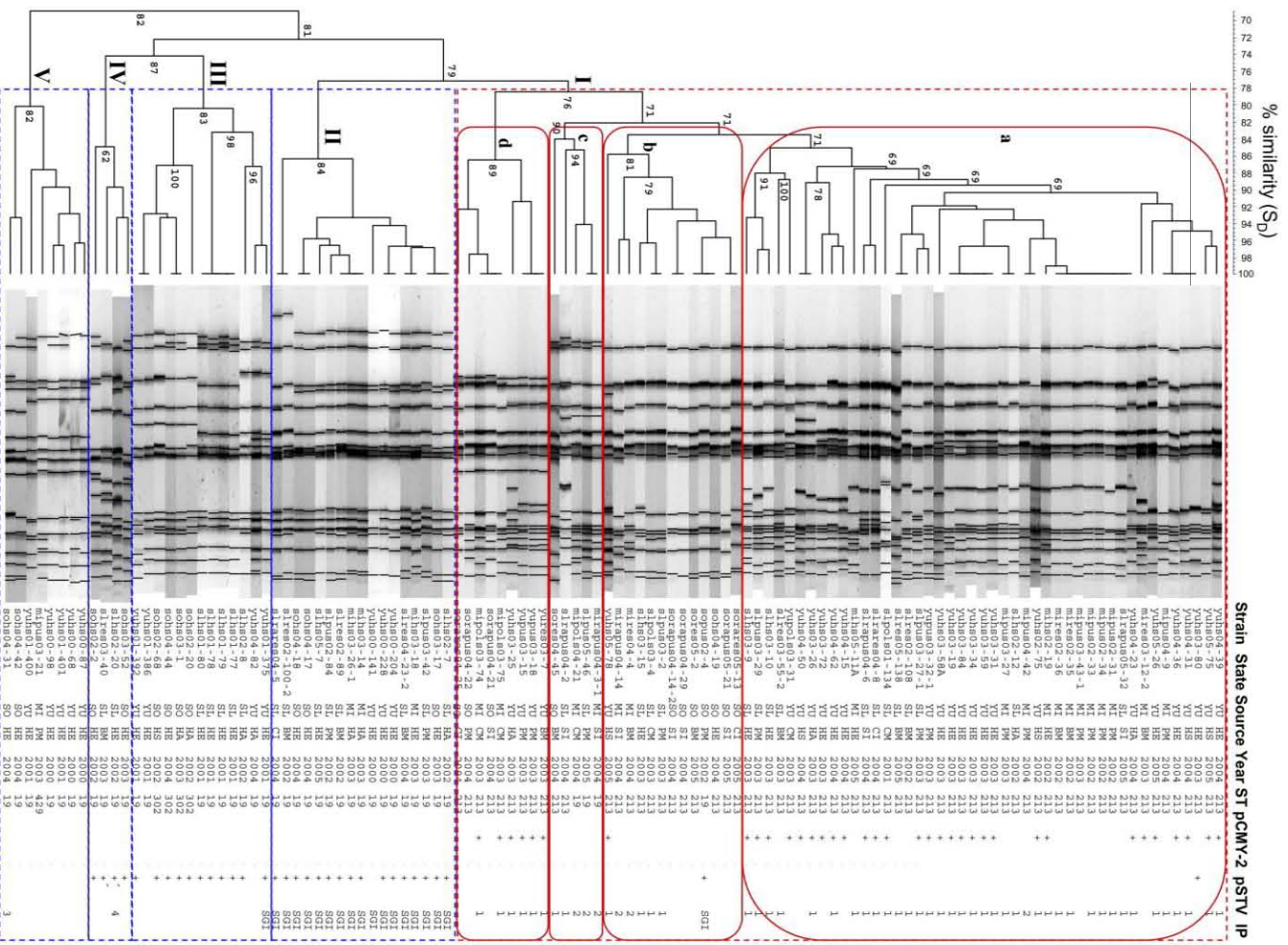


Figure 4 (see legend on next page)

Figure 4 (see previous page)

Dendrogram depicting the relationships of Mexican Typhimurium strains based on XbaI restriction patterns resolved by PFGE. The fingerprints were clustered by the UPGMA algorithm using Dice coefficients with 1.5% band position tolerance. Detailed information about strains can be found in Additional file 2. The strain column depicts the nomenclature used in the MLST database for the MEXSALM collection. Abbreviations for the state column: YU, Yucatán; MI, Michoacán; SL, San Luis Potosí; SO, Sonora. Abbreviations for the source column: HE, human enteric; HS, human systemic; HA: human asymptomatic; PM, pork meat; SI, swine intestine; BM, beef meat; CM, chicken meat; BI, beef intestine. The strains positive for the presence of pCMY-2 or pSTV are indicated by a plus symbol (+), the two strains marked with a '+' in the pSTV column are the strains for which *rck* could not be amplified. The nomenclature of integron profiles (IP1-IP4) is explained in the text. The five main clusters (I-V) are highlighted by dotted rectangles, and the four subgroups (a, b, c and d) in cluster I are indicated by oval boxes. Cophenetic values are shown for the clusters formed above 90% similarity.

allowed us to discover genetic subgroups within the isolate set.

Discussion

Low genetic diversity of core and accessory genes

Both housekeeping and accessory genes displayed extremely low levels of genetic diversity; even the third codon positions were invariable. The low genetic diversity and the clonal pattern of descent of accessory elements could be explained by several evolutionary processes, such as rapid clonal expansion of the population, genetic drift, the existence of barriers to genetic exchange among subgroups within the population, or a combination of these possibilities [4,5,8,52,53]. Most of the genetic diversity was provided by the presence/absence of accessory genes, including plasmids (pSTV and pCMY-2), integrons (IP-1 to 4 and IP SGI), and a chromosomally inserted island (SGI1), rather than by nucleotide polymorphisms. This result is in agreement with the conclusions derived from *Salmonella* whole genome comparisons and microarray data [53-56].

Geographic distribution of multilocus genotypes and antimicrobial resistance

Both MLST and PFGE analysis revealed the presence of widely distributed Typhimurium clones that were isolated from human and food-animal sources, during different years and from diverse geographic locations in Mexico. Taken together, our results indicate that: 1) there are effective mechanisms for the dissemination of *Salmonella* throughout the country and, thus, the entire sample can be considered a single population; 2) the isolates found in food-animals and humans are related; and 3) the clones causing disease in humans do not differ from those circulating in healthy humans or animals. The observation that isolates from human and food-animal sources come from the same genetic pool is in agreement with our previous reports [29,57], and with studies from other parts of the world [10,13], supporting the hypothesis of *Salmonella* transmission through the food chain. The fact that the isolates causing disease (enteric or invasive) in humans are not distinct clones from those carried by healthy humans

and animals, suggest differences in the bacterial inoculum, immune status of the host and modes of transmission. Furthermore, there may be differences in virulence determinants affecting the pathogenic capabilities, that cannot be distinguished by the methodologies applied in this study.

We found that the derived ST213 is replacing the founder ST19. Genotype replacement has been previously reported for *Salmonella*, as well as other bacterial species and virus. For example, the replacement of Typhimurium DT204 by the globally disseminated DT104 has been reviewed elsewhere [58,59]. The comparison of historic (1988-1995) and contemporary (1999-2001) serovar Newport isolates showed that they belonged to clearly separated PFGE clusters [60]. Shifts in the clonal prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* have been documented in hospitals from Spain and Portugal [61,62]. These results show that short periods of time are enough to observe drastic changes in genotype circulation, as reported in the present study. The geographic differences in the number of resistance determinants in ST213, in particular, the extended-spectrum cephalosporin resistance in isolates from Yucatán (97%) as compared with isolates from Sonora (0%), could be reflecting regional differences in the use of antibiotics in animal production. In this study we found strong associations among antimicrobial determinants. For example, all the *cmv-2* positive isolates carried IP-1, were positive for *floR* and presented the pentaresistant phenotype. This finding is in line with several studies that report the spread of large transferable plasmids carrying multiple resistance determinants [18,28-30,34,36,48,63,64]. The pentaresistant phenotype was also displayed by isolates harbouring the chromosomally inserted SGI1, which demonstrates that the same resistance phenotype can have a completely different genetic background, as reported by others [18,65].

Because of the recent dissemination of *cmv-2* positive Typhimurium isolates in Mexico [29], the genotypic characterization of our isolates is of public health relevance

and provides useful information that can be used to improve the integrated food chain surveillance system that is being established in this developing country [57].

Distribution of pSTV among hosts and chromosomal genotypes

Whether the pSTV is necessary to produce systemic infections in humans has been subject of intense debate. Some authors claim that there is lack of evidence of an association between the carriage of pSTV and human bacteremia [24]. Other authors suggest that *spv* genes promote the dissemination of Typhimurium from the intestine [26]. In a recent report, Heithoff et al. (2008) found that all the Typhimurium strains isolated from humans with bacteremia or animals possessed pSTV, while 34% of the strains isolated from human gastroenteritis lacked pSTV [66]. These results are in contrast with the data obtained in the present study. Unexpectedly, we found that less than half of all human strains harboured pSTV, and only one of the six isolates recovered from patients with systemic infection had pSTV, supporting the view that pSTV is not essential for human systemic infections. On the other hand, pSTV was significantly associated with human isolates (Table 2), indicating that the ST19-pSTV genotypes are adapted to the human host, while ST213 genotypes are adapted to both animal and human hosts. In conclusion, our data supports the notion that pSTV has a role in host adaptation [14], however, are not consistent with the view that pSTV is associated with systemic infection in humans.

There are some reports describing the differential distribution of pSTV within Typhimurium genotypes. Olsen et al. (2004) performed plasmid transfer experiments with the aim of demonstrating that different Typhimurium genotypes differed in their ability to obtain and express pSTV [21]. Ou and Baron (1991) observed that the introduction of a plasmid from a highly virulent strain did not increase virulence in all strains, particularly in those that were moderately virulent with their own plasmids, or did not contain a pSTV [22]. These reports highlight the importance of the genomic background in the interaction with the pSTV. In the present study we found a statistical association between genomic background and the presence of pSTV. This finding is also consistent with the PFGE dendrogram, in which subgroups are strongly associated with the presence or absence of pSTV.

We found that almost all the isolates harbouring the pSTV were ST19 (85%), while all the isolates harbouring pCMY-2 were ST213. Since ST213 is a recently derived genotype from ST19, and ST213 isolates did not harbour pSTV, it is appealing to speculate that ST213 arose as a derived clone lacking pSTV (which is a idiosyncratic plasmid of *Salmonella*), and that this condition allowed the acquisition of

pCMY-2 (which is a broad host range plasmid of Enterobacteriaceae).

Distribution of pCMY-2 among chromosomal genotypes

Since the presence of pCMY-2 in *Salmonella* is very recent compared to other Enterobacteriaceae, its differential distribution within genotypes of a single *Salmonella* serovar is scarcely documented. The association of the AmpC phenotype with a subgroup of genotypes has been documented mainly for Newport. Gupta et al. (2003) found that the isolates with this phenotype presented highly related PFGE restriction patterns that differed from those of the susceptible isolates [63]. Harbottle et al. (2006) found that all the Newport isolates with the multidrug resistant AmpC phenotype were grouped in a single PFGE cluster, and belonged to only two of the 12 STs present in the sample [13]. Zhao et al. (2007) found that the cephalosporin resistant Newport isolates presented related PFGE fingerprints and differed from those of susceptible isolates. Similar findings were reported for serovar Dublin [41]. On the other hand, Alcaine et al. (2005) studied Typhimurium, Agona and Schwarzengrund isolates from dairy farms, and did not find particular STs associated with the presence of *cmv-2*, concluding that *cmv-2* positive isolates evolved independently by horizontal gene transfer [11]. Our data strongly suggest that in the Mexican Typhimurium population pCMY-2 is associated with multidrug resistance and is harboured only by ST213 genotypes.

Integrations as source of strain diversity

In this work we found four types of integrations encompassing nine different genes (*aadA2*, *aadA5*, *aadA12*, *dfrA12*, *dfrA17*, *oxa-2*, *pse-1*, *orfD*, and *orfF*). Seven of them were genes encoding antimicrobial resistance determinants well known to be associated with integrations in the Enterobacteriaceae [32,67], and two were open reading frames with unknown function but also previously reported as gene cassettes [32]. To a large extent, the presence of integrations and plasmids defined the distinctive features of the main genetic subgroups, and provided strain diversity to an otherwise almost uniform population. These elements are known to be an integral part of the mobile or floating genome, and represent a fundamental resource for bacterial evolution [68-70].

The two integrations designated in this study as IP-1 and IP-2 have been found in several *Salmonella* serovars (e. g. Anatum, Branderup, Brikama, Enteritidis, Mbandaka, Rissen, Saintpaul and Typhimurium), and in other Enterobacteriaceae, such as *E. coli* [37-41]. In a recent study these integrations were detected in three *Staphylococcus* species isolated in China [51], providing evidence of the successful spread of this integrations around the world and across bacterial phyla. BLAST searches showed the presence of the

dfrA12, *orfF* and *aadA2* integron in 47 isolates proceeding from Proteobacteria (Enterobacteriales, Pseudomonadales, Aeromonadales and Vibrionales) and Firmicutes (Bacillales and Lactobacillales). The majority of the nucleotide sequences from these isolates were identical, suggesting that this integron has been recently acquired by a broad range of bacterial species. In many of these cases the location of the integron in plasmids has been documented, in agreement with the results found in the present study, which may account for its widespread distribution.

In contrast to prior evidence of horizontal transfer of *dfrA12*, *orfF* and *aadA2* across bacterial lineages, in the present study we found that the distribution of this integron was not random across chromosomal backgrounds, since these were found only in ST213 isolates. A similar situation was observed for SGI1, for which a rather narrow distribution was observed (mainly cluster II isolates), despite the proved mobility of SGI1 [42]. Our results provide evidence for the clonal dissemination of the island rather than lateral transfer among diverse genotypes. The association of pSTV with isolates harbouring SGI1 has been previously described [71,72]. Taken together, these results point out that although this Mexican Typhimurium population is exposed to a broad genetic pool of accessory genes, there are associations and restrictions among genomic backgrounds and the environmental floating genome.

Conclusion

The analysis of core and accessory genes in Mexican Typhimurium isolates allowed us to identify genetic subgroups within the population. We found strong statistical associations among chromosomal genotypes and accessory genes. The general patterns of association can be summarized as follows: 1) the isolates harbouring pSTV were ST19 or ST302, 2) all the isolates with SGI1 were ST19 and most carried pSTV, 3) all the isolates harbouring pCMY-2 were ST213, and 4) all IP-1 were carried by ST213 isolates. The low genetic diversity and the clonal pattern of descent of accessory elements could be explained by a combination of evolutionary processes. This study provides information about the importance of the accessory genome in generating genetic variability within a bacterial population.

Methods

Salmonella isolates and antimicrobial susceptibility testing

This study used 114 Typhimurium isolates collected for a Mexican surveillance network comprised by four states. The geographic locations of these states range from the southeastern to the northwestern part of Mexico. The more distant states (Yucatán and Sonora) are about 2,000

km apart and the closest states (Michoacán and San Luis Potosí), about 450 km apart.

In all states, food-animal production is a major economic activity, and most of the circulating retail meat is locally produced. The sampling scheme was designed to follow the food chain in a temporal fashion; details about the epidemiologic design can be found in Zaidi et al. (2008). Briefly, isolates from ill humans were obtained from patients at state referral hospitals; isolates from asymptomatic humans were collected from the feces of kindergarten children; raw retail pork, beef and chicken were purchased at supermarkets, butcher shops and open markets; and intestines were obtained from food-animals at slaughter from municipal abattoirs [57,73]. The internal review boards and ethics committees of all collaborating hospitals in the surveillance network approved the protocol, and written informed consent was collected from the guardians of all participants to obtain fecal and/or blood samples, and use the clinical and microbiologic information for scientific studies [57].

We did not use a systematic randomization method for selecting strains for this study. Using a chart with a list of each isolate by city of origin, strains were manually selected by including at least one strain from animals, meat or humans from a total of 61 cities. The sample included 38 isolates from Yucatán, 22 from Michoacán, 32 from San Luis Potosí and 22 from Sonora. Sixty-two isolates were from human samples (45 with diarrhea, 11 asymptomatic and 6 with systemic infection), and 52 from food-animals (18 from pork, 14 from beef, 6 from chicken meat, 10 from swine intestine, and 4 from cattle intestine). Isolates collected during 2000 and 2001 were only available from Yucatán and San Luis Potosí. Isolates collected from 2002 to 2005 were available for all four states (Table 1 and Figure 3).

Isolates biochemically confirmed to be *Salmonella* were serotyped according to the Kauffmann-White scheme with commercial antisera, as described elsewhere [73]. All isolates were tested with the disk diffusion method [74] for susceptibility to ampicillin, chloramphenicol, sulfisoxazole, streptomycin, tetracycline, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin and ceftriaxone. The minimum inhibitory concentrations (MICs) for ciprofloxacin and ceftriaxone were determined by agar dilution according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [75]. For the interpretation of MIC results for ciprofloxacin, high-level resistance was defined as a MIC value ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; low-level resistance was defined as a MIC value ≥ 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and ≥ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

MLST analysis

Genomic DNA was extracted using the AquaPure Genomic DNA Kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). PCR amplifications were performed with *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), products were purified with a PCR purification kit from Qiagen (Valencia, California, USA) according to the manufacturer's recommendation, and submitted for sequencing at Macrogen (Seoul, South Korea).

MLST was based on the partial sequences (~450 bp) of the following seven housekeeping genes: *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* and *thrA*, according to the *Salmonella* MLST database [45]. The primers for PCR and sequencing were previously described by Kidgell et al. (2002) [53]. Sequences were edited and aligned using Clustal W as implemented in BioEdit [76], and submitted to the MLST website for allele number assignment. The different sequences at each locus were assigned to an existing or novel allele, and each unique allelic profile (or multilocus genotype) was assigned to a sequence type (ST).

The clonal relatedness of the STs was determined using eBURSTv3 [77]. This program discerns the most parsimonious patterns of descent of isolates within a clonal complex from the predicted founder. The primary founder is predicted on the basis of parsimony, as the ST that has the largest number of single-locus variants in the group or clonal complex. Clonal complexes are thought to emerge from the rise in frequency and subsequent radial diversification of clonal founders [77].

The MLST analysis for the first 66 isolates analyzed showed that mostly *purE* presented polymorphisms among the seven genes assessed. Since this gene had the ability to discriminate the three main STs present in the isolate set, we decided to implement an economical three-gene MLST for the remaining 48 isolates of the sample, as suggested elsewhere [10-12]. The genes selected were *purE*, *thrA* and *sucA*; the latter two on the basis of their variability among the *Salmonella* [45]. Only the seven-gene MLST data were submitted to the *Salmonella* MLST database.

PFGE macro-restriction analysis

PFGE fingerprints for the isolates collected from 2002 to 2005 were previously generated for the surveillance network reported by Zaidi et al. (2008) [57]. For isolates collected during 2000 and 2001, the macro-restriction analysis was performed using the same conditions, following the methodology developed by the Centers for Disease Control and Prevention (USA) [78]. The *Xba*I restriction patterns were clustered using the unweighted pair-group method with arithmetic averages. The analyses were done with GelComparII using band matching and

Dice coefficients with a 1.5% band position tolerance. The consistency of the PFGE clusters was obtained by calculating cophenetic values as implemented in GelComparII. This method calculates the correlation between the dendrogram-derived similarities and the matrix similarities.

Detection of pSTV and pCMY-2

Additional file 3, lists the primers and conditions for detection of pSTV by PCR amplification of *spvC*, *rck* and *traT*, and the presence of *cmv-2*. To determine the size of pSTV and pCMY-2, plasmid profiles were generated by a modification of the alkaline lysis procedure [79]. The plasmid profile gels were transferred to positively charged membranes (Amersham Hybond™-N+) and hybridised with *spvC* and *cmv-2* probes. Probes were derived from the PCR products and labelled radioactively with ³²P. Hybridizations were performed under high stringency conditions at 65–68 °C.

Detection of integrons and SGI1

The primers and conditions used to detect integrons and SGI1 are listed in Additional file 3. Integrons were detected using primers CS-F and CS-R, targeting the 5' and 3' CS, which amplify the inserted cassettes (Figure 2). These primers were also used for integron sequence determination. For sequencing of IP-1, which contains three gene cassettes (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*), a third internal primer (STR-R1) targeting the region *aadA2* was used. The isolates displaying the two integrons typical of SGI1 were subject to amplification of the left, right and retronphage junctions, as well as for the antimicrobial resistance genes *tetG*, *floR*, *pse-1* and *aadA2*. To further characterize the 5' and 3' CS regions of integrons, as well as to search for isolates containing integrons without gene cassettes, the class 1 integrase (*intI1*) and *qacEA1* genes were amplified.

To determine the location of integrons for some representative isolates, plasmid profiles were generated and transferred to positively charged membranes. Probes were derived from the PCR products of *intI1* and *aadA2* genes, and labelled radioactively with ³²P. Hybridizations were performed under high stringency conditions at 68 °C.

Statistical Analysis

Statistical testing of differences in proportions was conducted using the chi-square test with Yates' correction; *p* values < 0.05 were considered significant. Strength of association between nominal variables was assessed by calculating the odds ratio (OR).

Nucleotide accession numbers and database searches

Only one representative sequence for each of the alleles found was submitted to the GenBank database. The *spvC*, *rck*, *traT*, *aadA2* and *pse-1* partial sequences for strain sopus02–4 were submitted under accession numbers

[GenBank:FJ460230], [GenBank:FJ460231], [GenBank:FJ460232], [GenBank:FJ460233] and [GenBank:FJ460234], respectively. The *cmv-2* and IP-1 (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*) partial sequences of strain yuhs04-31 were submitted under accession numbers [GenBank:FJ460235] and [GenBank:FJ460236], respectively. IP-1 from strain sores04-45 was submitted under accession number [GenBank:FJ460237]. IP-2 (*dfrA17* and *aadA5*) partial sequence from strain mirapus04-3-1 was submitted under accession number [GenBank:FJ460238]. IP-3 (*oxa-2* and *orfD*) from strain sohs04-31 was submitted under accession number [GenBank:FJ460239]. IP-4 (*aadA12*) from strain slhs02-20 was submitted under accession number [GenBank:FJ460240]. The nucleotide sequences generated in this work were compared to public databases using the BLAST algorithm at NCBI [80].

Authors' contributions

MW performed most of the MLST and part of the PFGE data, helped in the generation and analysis of the data from the accessory genes, and helped to draft the manuscript. MBZ provided the isolates, performed the antimicrobial susceptibility tests and most of the PFGE data, participated in the study design, performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. EC started the conception of the study, participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. MFM participated in the performance of the laboratory work, such as the PCR assays, plasmid extraction procedures and southern hybridizations. JJC participated in the initial design of the epidemiological study and in the conception of this study. CS conceived and performed most of the work on the analysis of the accessory genome, helped in the generation of the MLST data, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was partially funded by research grants to EC from CONACyT, Mexico (No. 46115Q and 82383) and DGAPA/UNAM (No. IN201407); by a DGEP/UNAM scholarship and Ph.D. fellowship from CONACyT (No. 238861/214945) to MW; and by a CONACyT postdoctoral fellowship (No. 54956) to CS. B.25.2We thank Pablo Vinuesa for thoughtful discussions; the constructive comments of two anonymous reviewers; Freddy Campos (Mérida) for technical assistance; and to Eugenio López, Santiago Becerra, Paul Gaytán and Jorge Yañez for primer synthesis at the Instituto de Biotecnología, UNAM.

Additional material

Additional file 1

Figure S1 – Clonal complex for the four multilocus genotypes found in the Mexican Typhimurium population. Representation of the clonal relatedness of STs. Figure S1 – Clonal complex for the four multilocus genotypes found in the Mexican Typhimurium population. The eBURST diagram show the genetic relationships for 66 Typhimurium strains based on the MLST data. ST 19 was unambiguously (100% bootstrap support) predicted as the founder genotype, with STs 213, 302 and 429 related as single locus variants of ST19. The size of the circles is proportional to the number of isolates belonging to each ST.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-9-131-S1.ppt]

Additional file 2

Table S1 – Complete list of strains and results. The complete list of strains, sampling information and results of the genotypic and phenotypic characterization is presented. Table S1 – Complete list of strains and results. The complete list of strains, sampling information and results of the genotypic and phenotypic characterization is presented.

Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-9-131-S2.doc]

Additional file 3

Table S2 – Primers used in this study. The primer sequences, amplification sizes, annealing temperatures and references are listed. Table S2 – Primers used in this study. The primer sequences, amplification sizes, annealing temperatures and references are listed.

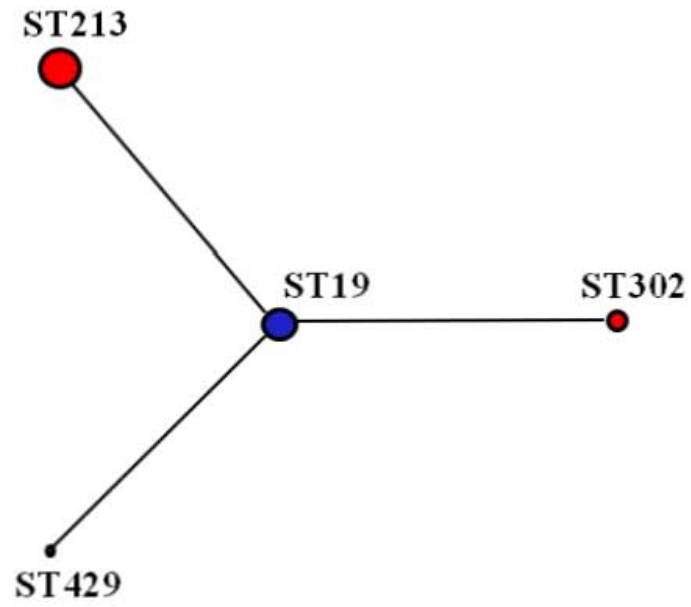
Click here for file

[http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2180-9-131-S3.doc]

References

1. Medini D, Donati C, Tettelin H, Masignani V, Rappuoli R: **The microbial pan-genome.** *Curr Opin Genet Dev* 2005, **15**:589-594.
2. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, et al.: **Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome".** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:13950-13955.
3. Young JP, Crossman LC, Johnston AV, Thomson NR, Ghazoui ZF, Hull KH, Wexler M, Curson AR, Todd JD, Poole PS, et al.: **The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components.** *Genome Biol* 2006, **7**:R34.
4. Levin BR, Bergstrom CT: **Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:6981-6985.
5. Feil EJ: **Small change: keeping pace with microevolution.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:483-495.
6. Maynard-Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG: **How clonal are bacteria?** *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**:4384-4388.
7. Selander RK, Li J, Nelson K: **Evolutionary genetics of *Salmonella enterica*.** In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* Edited by: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff VVS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1996:2691-2707.

Additional file 1. Figure S1.



Strain	Source	State	Year	ST ^b	PFGE	pSTV										Antimicrobial phenotype ^a												
						<i>spvC</i>	<i>rck</i>	<i>traT</i>	IP	<i>int1</i>	<i>qacE1</i>	SGI1 ^c	<i>aadA2</i>	<i>pse1</i>	<i>tetG</i>	<i>floR</i>	AMP	CHL	SSS	STR	TET	GM	KM	NAL	SXT	CRO	CIP	
Human source																												
YUHS 00-68	Diarrhea	Yucatán	2000	19	V	-	nt	nt	-	-	-	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	0.12/S-	0.06/S	
YUHS 00-87	Diarrhea	Yucatán	2000	19	V	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S-	0.06/S	
YUHS 00-98	Diarrhea	Yucatán	2000	19	V	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	0.25/S	0.06/S	
YUHS 00-141	Diarrhea	Yucatán	2000	19a	II	-	-	-	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.06/S-	0.03/S	
YUHS 00-204	Diarrhea	Yucatán	2000	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.06/S-	0.03/S	
YUHS 00-228	Diarrhea	Yucatán	2000	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.25/S	0.015/S	
YUHS 01-375	Diarrhea	Yucatán	2001	19	III	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	R	0.06/S-	0.03/S		
YUHS 01-386	Diarrhea	Yucatán	2001	19a	III	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	S	R	S	S	S	S	0.5/S	0.03/S		
YUHS 01-392	Diarrhea	Yucatán	2001	19a	III	+	+	+	-	-	-	nt	nt	nt	nt	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.25/S-	0.03/S		
YUHS 01-400	Diarrhea	Yucatán	2001	19	V	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	R	S	S	S	R	0.12/S	0.03/S		
YUHS 01-401	Diarrhea	Yucatán	2001	19	V	-	nt	nt	-	-	-	nt	nt	nt	w	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.12/S-	0.06/S		
YUHS 04-82	Asymptomatic	Yucatán	2004	19	III	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	S	S	S	S	0.12/S-	0.03/S		
YUHS 02-75	Systemic infection	Yucatán	2002	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	64/R+	0.06/S	
YUHS 03-19	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	64/R+	1.0/LLR	
YUHS 03-25	Asymptomatic	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	128/R+	0.03/S	
YUHS 03-26	Asymptomatic	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	32/R+	0.03/S	
YUHS 03-31	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	64/R+	0.12/S	
YUHS 03-34	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	64/R+	0.12/S	
YUHS 03-58A	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	32/R	0.03/S	
YUHS 03-59	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	32/R+	0.03/S	
YUHS 03-72	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	-	-	+	-	nt	nt	nt	nt	S	R	S	R	I	S	S	1	S	32/R+	0.06/S		
YUHS 03-80	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	+	+	+	-	-	-	nt	-	-	nt	+	R	R	R	R	R	S	S	R	R	0.25/S-	0.12/S	
YUHS 03-84	Diarrhea	Yucatán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	32/R+	0.12/S	
YUHS 04-15	Diarrhea	Yucatán	2004	213	I	-	-	-	-	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	128/R+	0.03/S	
YUHS 04-23	Asymptomatic	Yucatán	2004	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	128/R+	0.12/S	
YUHS 04-31	Systemic infection	Yucatán	2004	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	32/R+	0.12/S	
YUHS 04-36	Diarrhea	Yucatán	2004	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	64/R+	0.12/S	
YUHS 04-39	Diarrhea	Yucatán	2004	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	64/R+	0.03/S	
YUHS 04-50	Systemic infection	Yucatán	2004	213	I	-	-	-	-	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	R	S	R	128/R+	0.03/S	
YUHS 04-62	Diarrhea	Yucatán	2004	213	I	-	-	-	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	64/R+	0.03/S	
YUHS 05-26	Diarrhea	Yucatán	2005	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	128/R+	0.12/S	
YUHS 05-75	Systemic infection	Yucatán	2005	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	64/R+	0.06/S	
YUHS 05-78	Systemic infection	Yucatán	2005	213	I	-	nt	nt	1	w	-	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	128/R+	0.12/S	
MIHS 03-14	Asymptomatic	Michoacán	2003	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	0.25/S	0.03/S	
MIHS 03-18	Diarrhea	Michoacán	2003	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.25/S	0.03/S
MIHS 03-26-1	Asymptomatic	Michoacán	2003	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	0.12/S	0.03/S	
MIHS 02-19	Diarrhea	Michoacán	2002	213	I	-	-	-	1	+	-	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	S	R	R	R	S	R	32/R+	0.06/S	
MIHS 05-11A	Diarrhea	Michoacán	2005	213	I	-	nt	-	1	+	-	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.12/S-	0.25/LLR	
SLHS 01-77	Diarrhea	San Luis Potosí	2001	19a	III	+	+	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.12/S-	0.06/S	
SLHS 01-78	Diarrhea	San Luis Potosí	2001	19a	III	+	+	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.12/S	0.06/S	
SLHS 01-79	Diarrhea	San Luis Potosí	2001	19a	III	+	+	+	-	-	-	nt	nt	nt	nt	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	

SLHS 01-80	Diarrhea	San Luis Potosi	2001	19a	III	+	+	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.12/S			
SLHS 02-20	Diarrhea	San Luis Potosi	2002	19	IV	+	-	+	4	+	+	-	nt	nt	-	w	R	S	R	R	R	S	R	S	R	0.12/S-	0.06/S	
SLHS 02-7	Asymptomatic	San Luis Potosi	2002	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	S	R	S	S	S	S	0.12/S	0.03/S	
SLHS 02-8	Asymptomatic	San Luis Potosi	2002	19	III	+	+	+	-	w	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.06/S	0.06/S	
SLHS 02-12	Asymptomatic	San Luis Potosi	2002	213	I	-	nt	nt	1	+	w	nt	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	S	R	R	0.25/S	0.12/S	
SLHS 03-10	Diarrhea	San Luis Potosi	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	32/R+	0.06/S	
SLHS 03-15	Diarrhea	San Luis Potosi	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	0.12/S-	0.5/LLR
SLHS 03-9	Diarrhea	San Luis Potosi	2003	213	I	-	nt	-	1	+	w	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	64/R+	0.06/S	
SLHS 05-7	Diarrhea	San Luis Potosi	2005	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	R	0.06/S-	0.03/S	
SOHS 02-2	Diarrhea	Sonora	2002	19	IV	+	+	+	-	w	w	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	
SOHS 03-17	Diarrhea	Sonora	2003	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	R	S	0.06/S	1.0/LLR	
SOHS 03-52	Diarrhea	Sonora	2003	19	IV	+	+	+	-	w	w	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	
SOHS 04-17	Diarrhea	Sonora	2004	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S	
SOHS 04-18	Diarrhea	Sonora	2004	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S	
SOHS 04-31	Diarrhea	Sonora	2004	19	V	-	nt	nt	3	+	+	-	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	S	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S	
SOHS 04-42	Diarrhea	Sonora	2004	19	V	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.12/S	0.03/S	
SOHS 02-20	Asymptomatic	Sonora	2002	302	III	+	+	+	-	w	w	nt	-	-	nt	w	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	
SOHS 02-68	Systemic infection	Sonora	2002	302	III	+	+	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	R	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	
SOHS 03-1	Asymptomatic	Sonora	2003	302	III	+	+	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S	
SOHS 04-44	Diarrhea	Sonora	2004	302	III	+	+	+	-	w	w	nt	nt	nt	nt	w	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0.06/S-	0.03/S	
SOHS 04-19	Diarrhea	Sonora	2004	213	I	-	nt	-	-	w	w	nt	nt	nt	nt	+	S	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S	
Animal source																												
YUPUS 03-15	Pork meat	Yucatán	2003	213a	I	-	nt	-	1	+	w	nt	+	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	S	S	S	R	64/R+	0.03/S	
YUPUS 03-18	Pork meat	Yucatán	2003	213	I	-	-	-	1	+	w	-	+	-	-	+	R	R	R	R	R	S	S	S	R	64/R+	0.03/S	
YUPUS 03-32-1	Pork meat	Yucatán	2003	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	+	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	64/R+	0.12/S	
MIPUS 02-31	Pork meat	Michoacán	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	w	nt	nt	nt	nt	+	S	R	R	R	R	R	R	I	I	R	0.12/S	0.03/S
MIPUS 02-33	Pork meat	Michoacán	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	R	I	I	R	0.06/S	0.12/S
MIPUS 02-34	Pork meat	Michoacán	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	R	R	0.06/S	0.12/S	
MIPUS 03-27	Pork meat	Michoacán	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	-	nt	nt	nt	+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.12/S	
MIPUS 03-43-1	Pork meat	Michoacán	2003	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	R	R	0.06/S	0.12/S	
MIPUS 04-42	Pork meat	Michoacán	2004	213a	I	-	nt	-	2	+	+	-	nt	nt	nt	w	S	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.06/S	
MIPUS 04-9	Pork meat	Michoacán	2004	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.25/LLR	
MIRAPUS 04-3-1	Pork intestine	Michoacán	2004	19	I	-	nt	nt	2	+	+	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S-	0.06/S	
MIRAPUS 04-14	Pork intestine	Michoacán	2004	213a	I	-	nt	nt	2	+	+	-	-	-	-	w	w	R	S	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.06/S	
MIPUS 03-21	Pork meat	Michoacán	2003	429	V	-	nt	nt	-	w	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0.12/S	0.03/S	
SLPUS 02-84	Pork meat	San Luis Potosi	2002	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.06/S	0.06/S	
SLPUS 03-42	Pork meat	San Luis Potosi	2003	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S	
SLPUS 05-46	Pork meat	San Luis Potosi	2005	19a	I	-	nt	nt	2	+	+	nt	-	-	w	w	R	S	R	R	R	R	R	R	R	0.12/S-	0.06/S	
SLPUS 03-2	Pork meat	San Luis Potosi	2003	213a	I	-	nt	nt	1	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	R	S	S	R	R	0.06/S-	0.03/S	
SLPUS 03-27-1	Pork meat	San Luis Potosi	2003	213a	I	-	nt	nt	1	+	w	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	64/R+	0.06/S	
SLPUS 03-29	Pork meat	San Luis Potosi	2003	213	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	64/R+	0.12/S	
SLRAPUS 04-2	Pork intestine	San Luis Potosi	2004	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R		R	R	S	R	R	0.12/S	0.12/S	
SLRAPUS 04-6	Pork intestine	San Luis Potosi	2004	213a	I	-	nt	-	1	+	-	-	+	-	-	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32/R+	0.06/S	
SLRAPUS 05-32	Pork intestine	San Luis Potosi	2005	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0.06/S	0.03/S	

SOPUS 02-4	Pork meat	Sonora	2002	19	I	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.06/S-	0.016/S	
SORAPUS 04-14-2	Pork intestine	Sonora	2004	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S
SORAPUS 04-21	Pork intestine	Sonora	2004	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0.12/S	0.12/S
SORAPUS 04-22	Pork intestine	Sonora	2004	213	I	-	nt	nt	-	w	w	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	0.25/S	0.12/S
SORAPUS 04-29	Pork intestine	Sonora	2004	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S
SORAPUS 05-21	Pork intestine	Sonora	2005	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	0.12/S	0.5/LLR
YURES 03-7	Beef meat	Yucatán	2003	213	I	-	nt	-	1	+	w	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	S	S	S	R	32/R+	0.03/S	
MIRES 02-35	Beef meat	Michoacán	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	0.12/S	0.12/S
MIRES 02-36	Beef meat	Michoacán	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	w	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.12/S
MIRES 03-12-2	Beef meat	Michoacán	2003	213a	I	-	nt	nt	-	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	32/R+	0.03/S	
MIRES 04-4	Beef meat	Michoacán	2004	213	I	-	-	-	2	+	+	-	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S	0.06/S
SLRES 02-100-2	Beef meat	San Luis Potosí	2002	19	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.12/S-	0.03/S	
SLRES 02-89	Beef meat	San Luis Potosí	2002	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	0.12/S	0.03/S
SLRES 03-40	Beef meat	San Luis Potosí	2003	19a	IV	+	-	+	-	-	-	nt	nt	nt	nt	-	R	S	S	S	S	S	S	S	S	0.25/S	0.03/S	
SLRES 04-23-2	Beef meat	San Luis Potosí	2004	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S
SLRES 02-108	Beef meat	San Luis Potosí	2002	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	-	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	0.12/S	0.12/S
SLRES 03-55-2	Beef meat	San Luis Potosí	2003	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	0.25/S-	0.12/S
SLRES 05-138	Beef meat	San Luis Potosí	2005	213a	I	-	nt	nt	1	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.06/S-	0.06/S
SLRARES 04-5	Beef intestine	San Luis Potosí	2004	19a	II	+	+	+	SGI	+	+	L-R-RR	+	+	+	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	0.06/S	0.03/S
SLRARES 04-8	Beef intestine	San Luis Potosí	2004	213	I	-	-	-	1	+	-	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	32/R+	0.06/S
SORES 04-45	Beef meat	Sonora	2004	213	I	-	-	-	1	+	+	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	0.06/S-	1.0/LLR
SORES 05-2	Beef meat	Sonora	2005	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	0.06/S	0.5/LLR
SORARES 04-25	Beef intestine	Sonora	2004	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	0.25/S	0.06/S
SORARES 05-13	Beef intestine	Sonora	2005	213a	I	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	0.06/S	0.5/LLR
YUPOLS 03-31	Chicken meat	Yucatán	2003	213a	I	-	nt	nt	-	w	-	nt	-	-	-	+	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	64/R+	0.06/S
MIPOLS 04-21	Chicken meat	Michoacán	2004	19a	I	-	nt	nt	2	+	+	nt	-	-	w	w	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	0.06/S	0.12/S
MIPOLS 03-74	Chicken meat	Michoacán	2003	213a	I	-	-	nt	1	+	-	-	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	64/R+	0.5/LLR
MIPOLS 03-75	Chicken meat	Michoacán	2003	213	I	-	nt	-	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	64/R+	0.5/LLR
SLPOLS 01-134	Chicken meat	San Luis Potosí	2001	213a	I	-	-	-	1	+	-	nt	nt	nt	nt	+	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	32/R+	0.03/S
SLPOLS 03-4	Chicken meat	San Luis Potosí	2003	213a	I	-	nt	nt	1	+	+	nt	nt	nt	nt	nt	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	0.12/S	0.5/LLR

^a The pentaresistance phenotype is highlighted in italics. In the CRO column, the result of PCR *emv-2* amplifications are denoted by + or – symbols. For CRO and CIP the interpretation of MIC values (see Methods) are provided.

^b The strains for which the three-locus scheme was applied are indicated by a “a” after the ST number.

^c L-R-RR indicates positive results for the amplification of the left, right and right with retronphage junctions of SGI1.

+, -, w and nt symbols denote positive, negative, weak and not tested PCR amplifications products, respectively.

The PCR products for which nucleotide sequences were determined are highlighted with light grey boxes or dark grey boxes for the sequences submitted to GenBank.

Additional file 3. Table S2 - Primers used in this study.

Name	Gene	Sequence	Size ^a bp	T ^b °C	Reference
CMY-F	<i>cmv-2</i>	ATA ACC ACC CAG TCA CGC	600	58	(M'Zali <i>et al.</i> , 1997)
CMY-R		CAG TAG CGA GAC TGC GCA			
SpvC-1	<i>spvC</i>	ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA	550	55	(Chiu & Ou, 1996)
SpvC-2		TGT CTC TGC ATT TCG CCA TCA			
rck-F	<i>rck</i>	TCG TTC TGT CCT CAC TGC	500	50	(Guerra <i>et al.</i> , 2002)
rck-B		TCA TAG CCC AGA TCG ATG			
traT-F	<i>traT</i>	GAT GGT TAC ACT GGT CAG	500	56	(Guerra <i>et al.</i> , 2002)
traT-B		TCT GAG ATC TGT ACG TCG			
CS-F	cassette	GGC ATC CAA GCA GCA AG	variable	55	(Levesque <i>et al.</i> , 1995)
CS-R		AAG CAG ACT TGA CCT GA			
Pse-F	<i>Pse-1</i>	GGC AAT CAC ACT CGA TGA TGC GT	200	56	(Chiu <i>et al.</i> , 2006)
Pse-R		GGC TCA ATA CGG TCT AGA CGA GT			
STR-F1	<i>aadA2</i>	AGA CGC TCC GCG CTA TAG AAG T	250	58	(Chiu <i>et al.</i> , 2006)
STR-R1		CGG ACC TAC CAA GGC AAC GCT			
U7-L12	Left	ACA CCT TGA GCA GGG CAA AG	600	60	(Boyd <i>et al.</i> , 2001)
LJ-R1	junction	AGT TCT AAA GGT TCG TAG TCG			
104-RJ	Right	TGA CGA GCT GAA GCG AAT TG	600	60	(Boyd <i>et al.</i> , 2001)
C9-L2	junction	AGC AAG TGT GCG TAA TTT GG			
104-D	retron	ACC AGG GCA AAA CTA CAC AG	5,000	60	(Boyd <i>et al.</i> , 2001)
FloR-F	<i>floR</i>	CTT TGG CTA TAC TGG CGA TG	300	58	(Chiu <i>et al.</i> , 2006)
FloR-R		GAT CAT TAC AAG CGC GAC AG			
TetG-F	<i>tetG</i>	AGC AGC CTC AAC CAT TGC CGA T	400	56	(Chiu <i>et al.</i> , 2006)
TetG-R		GGT GTT CCA CTG AAA ACG GTC CT			
Int1-F	<i>int1</i>	GCC TTG CTG TTC TTC TAC GG	500	56	(Ng <i>et al.</i> , 1999)
Int1-R		GAT GCC TGC TTG TTC TAC GG			
qacE1-F	<i>qacEΔ1</i>	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	250	56	(Sandvang <i>et al.</i> , 1998)
qacE1-R		CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC			

^a Approximate product amplification size.

^b Annealing temperature.

References.

1. M'Zali FH, Heritage J, Gascoyne-Binzi DM, Denton M, Todd NJ, Hawkey PM: **Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Leeds hospital.** *J Antimicrob Chemother* 1997, **40**:823-831.
2. Chiu CH, Ou JT: **Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**:2619-2622.
3. Guerra B, Soto S, Helmuth R, Mendoza MC: **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* 2002, **46**:2977-2981.
4. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH: **PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes.** *Antimicrob Agents Chemother* 1995, **39**:185-191.
5. Chiu CH, Su LH, Chu CH, Wang MH, Yeh CM, Weill FX, Chu C: **Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2354-2358.
6. Boyd D, Peters GA, Cloeckert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR: **Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona.** *J Bacteriol* 2001, **183**:5725-5732.
7. Ng LK, Mulvey MR, Martin I, Peters GA, Johnson W: **Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:3018-3021.
8. Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB: **Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104.** *FEMS Microbiol Lett* 1998, **160**:37-41.

5.2 *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Salmonella Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants

Magdalena Wiesner¹, Edmundo Calva¹, Marcos Fernández-Mora¹, Miguel A Cevallos², Freddy Campos³, Mussaret B Zaidi³, Claudia Silva^{1*}

Abstract

Background: *Salmonella* Typhimurium ST213 was first detected in the Mexican Typhimurium population in 2001. It is associated with a multi-drug resistance phenotype and a plasmid-borne *bla*_{CMY-2} gene conferring resistance to extended-spectrum cephalosporins. The objective of the current study was to examine the association between the ST213 genotype and *bla*_{CMY-2} plasmids.

Results: The *bla*_{CMY-2} gene was carried by an IncA/C plasmid. ST213 strains lacking the *bla*_{CMY-2} gene carried a different IncA/C plasmid. PCR analysis of seven DNA regions distributed throughout the plasmids showed that these IncA/C plasmids were related, but the presence and absence of DNA stretches produced two divergent types I and II. A class 1 integron (*dfxA12*, *orfF* and *aadA2*) was detected in most of the type I plasmids. Type I contained all the plasmids carrying the *bla*_{CMY-2} gene and a subset of plasmids lacking *bla*_{CMY-2}. Type II included all of the remaining *bla*_{CMY-2}-negative plasmids. A sequence comparison of the seven DNA regions showed that both types were closely related to IncA/C plasmids found in *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Photobacterium*, *Vibrio* and *Aeromonas*. Analysis of our Typhimurium strains showed that the region containing the *bla*_{CMY-2} gene is inserted between *traA* and *traC* as a single copy, like in the *E. coli* plasmid pAR060302. The *floR* allele was identical to that of Newport pSN254, suggesting a mosaic pattern of ancestry with plasmids from other *Salmonella* serovars and *E. coli*. Only one of the tested strains was able to conjugate the IncA/C plasmid at very low frequencies (10⁻⁷ to 10⁻⁹). The lack of conjugation ability of our IncA/C plasmids agrees with the clonal dissemination trend suggested by the chromosomal backgrounds and plasmid pattern associations.

Conclusions: The ecological success of the newly emerging Typhimurium ST213 genotype in Mexico may be related to the carriage of IncA/C plasmids. We conclude that types I and II of IncA/C plasmids originated from a common ancestor and that the insertion and deletion of DNA stretches have shaped their evolutionary histories.

Background

A substantial amount of the genetic variation in bacteria is carried in plasmids [1]. Plasmids are part of the flexible genome, which is defined by the high plasticity and modularity of its genetic elements and high rates of gene acquisition and loss [2]. They are typically composed of conserved backbone modules coding for replication, maintenance and transfer functions as well as variable accessory modules. The capture of genetic

modules by plasmid backbones can increase phenotypic diversity and thereby increase the chances of responding to uncertain environmental changes or of exploiting an opportunity for transient niche expansion [2,3]. Plasmids are classified according to incompatibility (Inc) groups that are based on the inability of plasmids with the same replication or segregation mechanisms to co-exist in the same cell [4]. IncA/C plasmids have attracted the attention of the research community due to their ability to acquire antimicrobial resistance traits and to mobilize them across geographical and taxonomical borders [5]. Recent comparative studies have addressed the evolutionary relationships among the IncA/C plasmids from

* Correspondence: csilvamex1@yahoo.com

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México
Full list of author information is available at the end of the article



Salmonella enterica, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Yersinia ruckeri*, *Vibrio cholera*, *Photobacterium damselae* and *Aeromonas salmonicida* [5-10]. Over the last decade, increasing attention has been focused on plasmids that harbour the antimicrobial resistance gene *bla*_{CMY-2}, which encodes an AmpC-type beta-lactamase that hydrolyzes third-generation cephalosporins [11-13]. In *Salmonella enterica*, *bla*_{CMY-2} is frequently carried by IncA/C or IncI1 plasmids [11,12,14,15].

In a previous study, we examined the genetic variation of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium population isolated from human and food-animal sources from four geographic regions in Mexico [16]. Multilocus sequence typing (MLST) and *Xba*I macro-restriction showed two predominant genotypes, ST19 and ST213. ST19 has been reported worldwide and is the most abundant Typhimurium genotype in the MLST database [17], while ST213 has only been reported in Mexico. Clonal complex analysis supported ST19 as the founder genotype, while ST213 was determined to be a derived genotype replacing ST19. We found a non-random distribution of virulence and antimicrobial resistance accessory genes across chromosomal backgrounds, and several associations among core and accessory genetic markers were detected. First, the *Salmonella* virulence plasmid (pSTV) was found in ST19 strains, but not in ST213 strains. Second, the plasmid-borne *bla*_{CMY-2} gene was found only in ST213 strains. Third, the most abundant integron, the integron profile one (IP-1; *dfrA12*, *orfF* and *aadA2*), was found only in ST213 strains. Fourth, the *Salmonella* genomic island (SGI1) was found in a subgroup of ST19 strains carrying pSTV [16]. The general picture obtained from that study was a population composed of two main genotypes marked by the presence of different accessory genes.

The emergence of the multi-drug resistant (MDR) ST213 genotype associated with resistance to expanded spectrum cephalosporins is a public health threat in Mexico where this clone has rapidly disseminated throughout certain regions, causing severe and fatal infections in infants [18]. The objective of the current study was to examine the association between the recently emerged genotype MDR ST213 and *bla*_{CMY-2} plasmids. ST213 isolates were analyzed by plasmid profiling, PCR replicon typing [19], plasmid *Pst*I restriction profiles [12,20], Southern hybridization, plasmid PCR screening and sequencing of regions scattered throughout the IncA/C plasmids [8], and by their conjugation abilities. We found two divergent types of IncA/C plasmids: one composed of plasmids possessing or lacking the *bla*_{CMY-2} region and the other lacking *bla*_{CMY-2}. We discuss our results in the context of epidemiological findings in Mexico, and we present evolutionary hypotheses regarding the origin of the two genetic types of IncA/C plasmids.

Results

Plasmid profiling, PCR replicon typing and plasmid size

The plasmid profiles of the 68 ST213 isolates showed that these strains carried a large number of plasmids (one to seven) in a wide range of sizes (3 to 160 kb) (Figure 1).

PCR replicon typing was performed for incompatibility groups that had been reported to be associated with either pSTV or *bla*_{CMY-2}, such as IncFII, IncFIB, IncA/C, IncHI2 and IncI1 [14,15,21,22]. All 36 isolates that carried *bla*_{CMY-2} were positive for the IncA/C group and negative for the other Inc groups. Unexpectedly, among

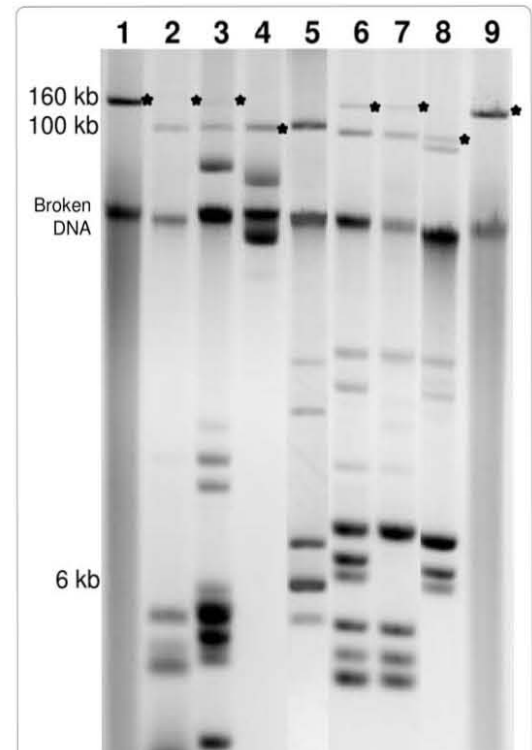


Figure 1 Electrophoretic plasmid profiles of representative strains of the Typhimurium ST213 genotype.

The diversity of plasmid sizes exhibited by strains carrying or lacking *bla*_{CMY-2} is shown. Lanes 1 and 9 show the *E. coli* reference plasmid pAR060302 [6], which was used as a 160-kb-size marker and as a positive control in the hybridization experiments. Lane 5 shows the plasmid profile of *E. coli* strain E2348/69 used as other size marker (100 and 6 kb) and as a negative control in the hybridization experiments. Lanes 2 to 4 display the plasmid profiles of *bla*_{CMY-2}-positive strains belonging to the IncA/C plasmid type I (see Results): YURES 03-7, YUHS 05-78 and YUHS 03-19, respectively. Lanes 6 and 7 show the plasmid profiles of *bla*_{CMY-2}-negative strains of plasmid type I: SLRES 02-108 and MIPUS 03-27, respectively, and lane 8 shows the plasmid profile of a representative strain of plasmid type II: SORAPUS 04-29. The IncA/C plasmids are indicated by an asterisk at the right side of the bands.

the 32 ST213 isolates lacking *bla*_{CMY-2}, 23 were positive for the IncA/C group. Additionally, the IncHI2 and IncI1 groups were detected in three and two isolates, respectively. Thirteen *bla*_{CMY-2}-negative and IncA/C-positive isolates were selected to represent different sources, states and years of isolation for further analysis, and compared them with the *bla*_{CMY-2}-positive isolates (hereafter referred to as CMY- and CMY+, respectively).

Alkaline lysis profiles and PFGE S1-digestion gels of plasmids from strains in our collection were hybridized

with *bla*_{CMY-2} and *repA/C* probes; all of the CMY+ isolates yielded signals in the same plasmids, confirming that *bla*_{CMY-2} is carried in large IncA/C plasmids (100 to 160 kb). In contrast, only the *repA/C* probe hybridized in the CMY- isolates, again targeting large plasmids (100 to 160 kb) (Figure 2). Consistent with their low copy number [9,12,15], the IncA/C plasmids yielded faint bands in the ethidium bromide-stained gels, especially those larger than 100 kb (Figure 1), but they were unambiguously detected in the hybridization experiments.

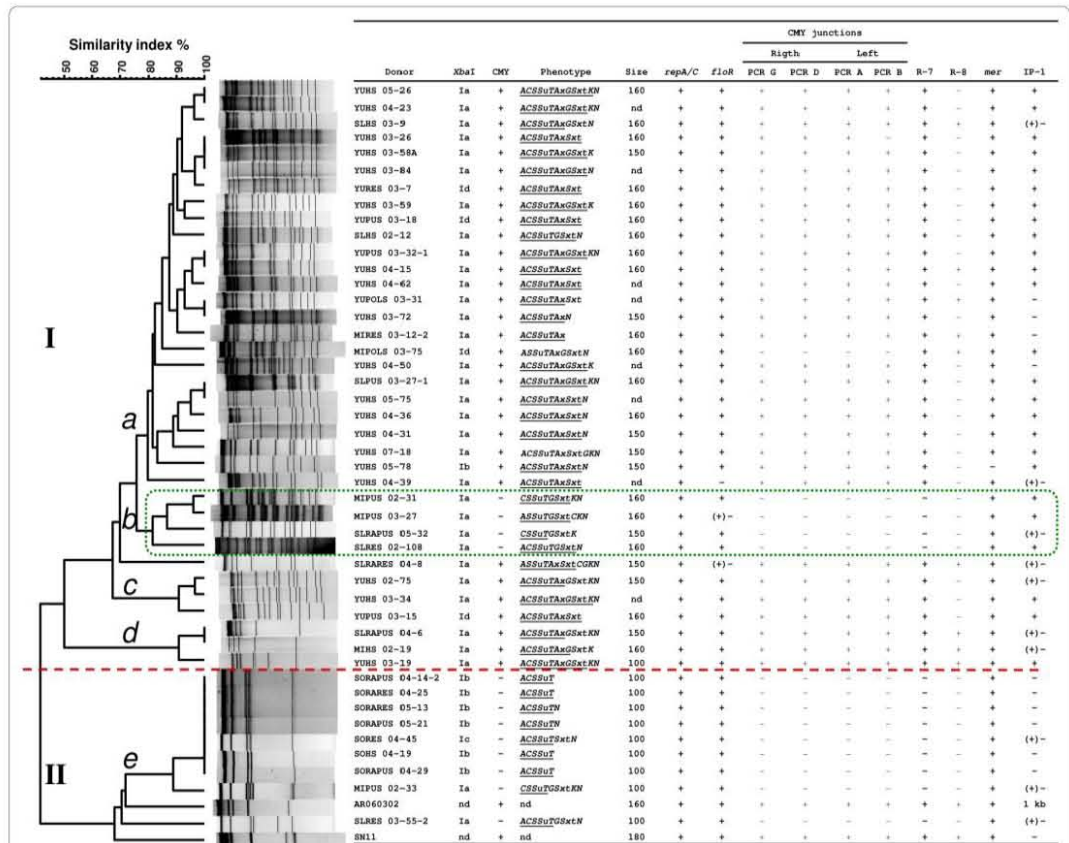


Figure 2 Dendrogram depicting the genetic relationships between the IncA/C plasmids based on *PstI* fingerprints. The dendrogram was constructed with the UPGMA algorithm using Dice coefficients with a 1.0% band position tolerance. The two main groups (designated as types I and II) are separated by a dotted line (similarity index <50%). The five clusters formed at similarity index values >80% are indicated by the letters a to e. Cluster b containing the *bla*_{CMY-2}-negative strains within type I is highlighted with a dotted box. The donor column refers to Typhimurium strains used as DNA sources for the transformation of *E. coli* TOP10 or DH5 α . The *XbaI* column indicates the cluster name in which the donor strain was placed in the previously published PFGE-*XbaI* restriction dendrogram [16]. The CMY column denotes *bla*_{CMY-2}-positive (+) and *bla*_{CMY-2}-negative (-) plasmids. The phenotype column describes the resistance phenotype of the donor strain and the resistances transferred by the IncA/C plasmids (underlined). The abbreviations for the antibiotics are described in Methods. The estimated plasmid sizes are indicated in terms of bp. The next ten columns display the results of the PCR screening scheme (Additional file 1, Table S1, Figure 3, Figure 4 and Methods). Positive amplifications are designated by a plus symbol (+) and negative amplifications by a minus symbol (-). In the case of the IP-1 and *floR* columns, the + (-) code indicates that the Typhimurium donor strain was positive for the marker but that the *E. coli* transformants were negative. *1 kb* indicates an integron of around 1,000 bp amplified in pAR060302, as previously described by Call et al. [6]. nd, not determined.

Characterization of IncA/C plasmids based on the antibiotic resistance phenotype

To isolate and characterize the IncA/C plasmids present in the Mexican ST213 genotype, *E. coli* TOP10 or DH5 α transformants were obtained using plasmid DNA isolated from 32 CMY+ and 13 CMY- strains. Ceftriaxone was used to select CMY+ plasmids, and chloramphenicol was used to select CMY- plasmids because this resistance has been found to be part of the IncA/C plasmid backbone [5,6,8].

All the transformants carrying the IncA/C plasmids also displayed resistance to ampicillin, chloramphenicol, sulphonamides, streptomycin and tetracycline. Resistance to gentamicin was conferred by most of the CMY+ plasmids, and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance was mostly detected in the plasmids containing the IP-1 integron (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*; see below). Resistance to neither kanamycin nor nalidixic acid was transferred (Figure 2). These results indicate that the MDR phenotypes of ST213 strains can be explained largely by the presence of IncA/C plasmids.

*Pst*I restriction fingerprints

The plasmid profiles showed that all of the *E. coli* transformants carried one large plasmid of between 100 and 160 kb. These transformants were analyzed by *Pst*I restriction fingerprinting [12,23]. Cluster analysis of the *Pst*I fingerprints showed two main plasmid types (similarity <50%), which we named type I and type II (Figure 2). All of the CMY+ plasmids were contained in type I and were distributed into three clusters (*a*, *c* and *d*). The CMY- plasmids were found in two distinct groups: one in type II and the other in cluster *b* within type I, suggesting that the CMY- plasmids originated from two divergent IncA/C plasmid types. To put our plasmids into context, IncA/C CMY+ reference plasmids from *E. coli* AR060302 [6] and Newport SN11 [22] were included. The restriction profiles of these plasmids were related to our ST213 type II plasmids, which in contrast were all CMY-.

We compared the sampling information (see Methods) and our previously generated genomic DNA *Xba*I macrorestriction patterns [16] with the plasmid *Pst*I restriction patterns. The observed distribution of the plasmids among genomic backgrounds was consistent with a pattern of clonal spread. The most evident association was between *Xba*I cluster Ib and *Pst*I cluster *e*; these isolates came from Sonora and were sampled in 2004-2005 (Figure 2).

PCR screening and nucleotide sequence analysis of the plasmids

The *E. coli* transformants were subjected to PCR screening using primer pairs that detect seven regions (*repA/C*,

floR, CMY region, R-7, R-8, *mer* and IP-1; Figure 3 and Additional file 1, Table S1) distributed throughout the reported IncA/C plasmids [5-8,10]. All the plasmids were positive for the *repA/C*, *floR* and *mer* regions (Figure 2); only one plasmid did not contain the *mer* region (strain YUHS 05-78). The R-7 segment was detected in all the CMY+ plasmids but in none of the CMY- plasmids. We analyzed the CMY region assuming that the right junction would consist of an insertion of *dsbC* upstream of *traC* and that the left junction would consist of an insertion of *tnpA* downstream of *traA* (PCRs G and A, respectively; Figure 4). However, during the nucleotide sequence analysis, we realized that *dsbC* and

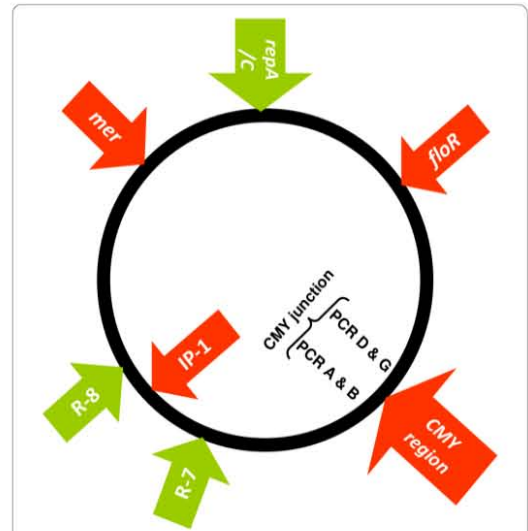
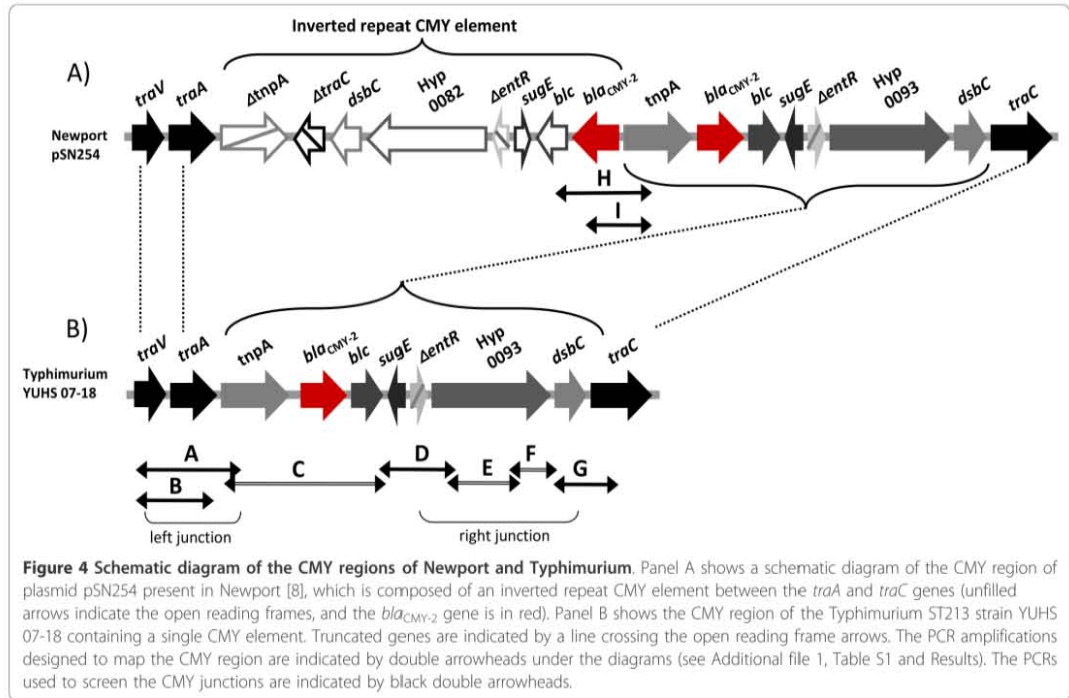


Figure 3 Schematic representation indicating the relative positions of the molecular markers used to characterize IncA/C plasmids. Seven regions distributed throughout the reported IncA/C plasmids [5-8,10] were detected by PCR in the 45 ST213 Typhimurium isolates. Antimicrobial resistance determinants are indicated in red. The 2,589-bp *repA/C* region includes the complete *repA* gene, which is involved in plasmid replication and incompatibility group determination. *floR* is a 1,050-bp region spanning almost the complete *floR* gene coding for chloramphenicol resistance. The insertion of the CMY island into the plasmid backbone between *traC* and *traA* was evaluated by PCR D and PCR G for the right junction, and by PCR A and B for the left junction (see Additional file 1, Table S1, Figure 4 and Results). Two regions included in the IncA/C plasmid PCR typing scheme proposed by Welch et al. [8] were analyzed. The 1,431-bp Region 7 (R-7) includes the *bet* gene coding for a phage recombination protein. Region 8 (R-8) is a DNA fragment of 1,600 bp that contains the *dcm* gene coding for a DNA methylase. The presence of the mercury resistance operon (*mer*), frequently associated with the Tn21 transposon [7,8], was evaluated by the amplification of a 2,185-bp region spanning from *merA* to *merT*. The presence of IP-1 (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*) was assessed using primers targeting its conserved sequences.



the hypothetical protein 0093 gene are part of the plasmid core of other closely related IncA/C plasmids lacking the CMY island (see below). Thus, PCR D was also used to detect the insertion of the CMY island at the right junction, demonstrating the insertion of *blc*, *sugE* and *ΔentR* upstream of the 0093 gene (Figure 4). To determine if the flanking region of *traA* is similar in the CMY+ and CMY- plasmids, the left junction was assessed by PCR B (Figure 4). As expected, the CMY-plasmids did not amplify the CMY junctions, whereas most of the CMY+ plasmids amplified the right and left junctions (Figure 2), indicating that with only one exception (strain MIPOLS 03-75), the CMY island is inserted in the same position in these plasmids. The most variable regions of the IncA/C plasmids were the R-8 segment and the IP-1 integron (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*). R-8 was present only in a small fraction of the CMY+ plasmids, including all the plasmids that belong to cluster *d*. Most (25 out of 35) of the *Salmonella* strains that were positive for the IP-1 integron transferred this region along with their IncA/C plasmids. The exceptions were six CMY+ plasmids and four CMY-plasmids (Figure 2). The presence of integrons has been reported for other IncA/C plasmids [6,7,9]. Ten strains representing different geographic locations, years and sources were chosen and their regions analyzed in the PCR screening were sequenced (Additional

file 2, Table S2). The sequences were identical for all the plasmids (both CMY+ and CMY-); only the *mer* region showed a single nucleotide substitution (Additional file 2, Table S2). It was surprising that even inter-genic regions and third codon positions were invariable. BLAST searches showed that our sequences are identical (100% identity) to the IncA/C plasmids pAR060302 (*E. coli*), peH4H (*E. coli*), pAM04528 (Newport) and pSN254 (Newport); are closely related (99-98%) to the IncA/C plasmids pIP1202 (*Yersinia pestis*), pYR1 (*Yersinia ruckeri*), pP91278 (*Photobacterium damsela*), pP99-018 (*P. damsela*) and pMRV150 (*Vibrio cholerae*); and are related (88-89% identity) to pRA1 (*Aeromonas hydrophila*) [5-10]. The *repA* gene displays the *repA/C₂* allele described for other IncA/C CMY+ plasmids [19]. Call et al. [6] reported that one of the most variable parts of the IncA/C plasmids is the *floR* gene; the *floR* allele found in the ST213 isolates is identical to that of pSN254, which differs from that of pAR060302 by three non-synonymous substitutions. The *traC-dsbC* junction (PCR G) of the CMY island (Figure 4) was found in all the plasmids mentioned above and in the recently described integrating conjugative element ICEPmiJpn1 of *Proteus mirabilis* [GenBank:AB525688]. The finding that *traC-dsbC* is present in pIP1202, pYR1, pP91278, pP99-018, pMRV150 and pRA1, which lack the CMY island, revealed that this gene cluster is part of a conserved core

region of these closely related IncA/C plasmids. However, this region did not match with any other plasmids in the database, and it was not amplified in the CMY-plasmids of ST213 (Figure 2). Therefore, to assess the insertion of the right CMY junction, a second marker was used: PCR D spanning from *sugE* to the hypothetical protein 0093 (Figure 4). The complete *traVA-tnpA* right junction (PCR A and B) of the CMY island was identical to that of the *E. coli* and Newport plasmids, but only *traVA* (PCR B) was present in the other CMY- IncA/C reference plasmids. This result indicates that this marker is the left CMY island junction. Interestingly, the ST213 CMY- plasmids did not amplify the *traVA* region, indicating that the region around the CMY island is not present in these plasmids. R-7 and R-8 were found to be present in all the IncA/C reference plasmids, with the only exception being peH4H, which lacks R-7. The *mer* region was detected only in the *E. coli* pAR060302 and Newport plasmids; however, it was found to be related to other *mer* operons present in several plasmids such as pRMH760 (*Klebsiella pneumoniae*).

Characterization of the CMY region

When we started this study, the only completely sequenced plasmid carrying *bla*_{CMY-2} was that of the Newport strain [GenBank:NC_009140] [8]. PCR mapping experiments were performed to compare the CMY region of our Typhimurium isolates with that of Newport pSN254 (Figure 4 and Additional file 1, Table S1).

To determine if the *bla*_{CMY-2} gene is present as an inverted repeat element as in pSN245, we performed PCR H and I, which we expected to produce bands of around 3.2 and 2.3 kb, respectively, based on the *in silico* prediction. The Newport strain SN11 was used as a positive control for these amplifications. No bands were obtained with our Typhimurium isolates, consistent with the notion that our isolates possess only a single *bla*_{CMY-2} gene. We designed a set of primer pairs to amplify overlapping fragments covering the complete CMY region and to obtain the nucleotide sequence of one of our isolates, YUHS 07-18, which is the most recent strain in our collection and which displays *Xba*I and *Pst*I fingerprints prevalent in the ST213 population. The 12,621-bp sequence of YUHS07-18 [GenBank: HQ203988] spanning from *traV* to *traC* was found to be identical to the corresponding region of pSN254 [GenBank:NC_009140] [8], and it has the same CMY region configuration as the *E. coli* plasmid pAR060302 [GenBank:FJ621588] [6].

Southern blot hybridization of *Pst*I plasmid restriction fingerprints

Representative examples of Southern hybridizations of the *Pst*I fingerprints are shown in Figure 5. Hybridization with the *bla*_{CMY-2} probe demonstrated that all CMY+ plasmids were of Giles type A [20], displaying two hybridization bands of about 12 and 0.6 kb. This type has been associated with plasmids that carry one copy

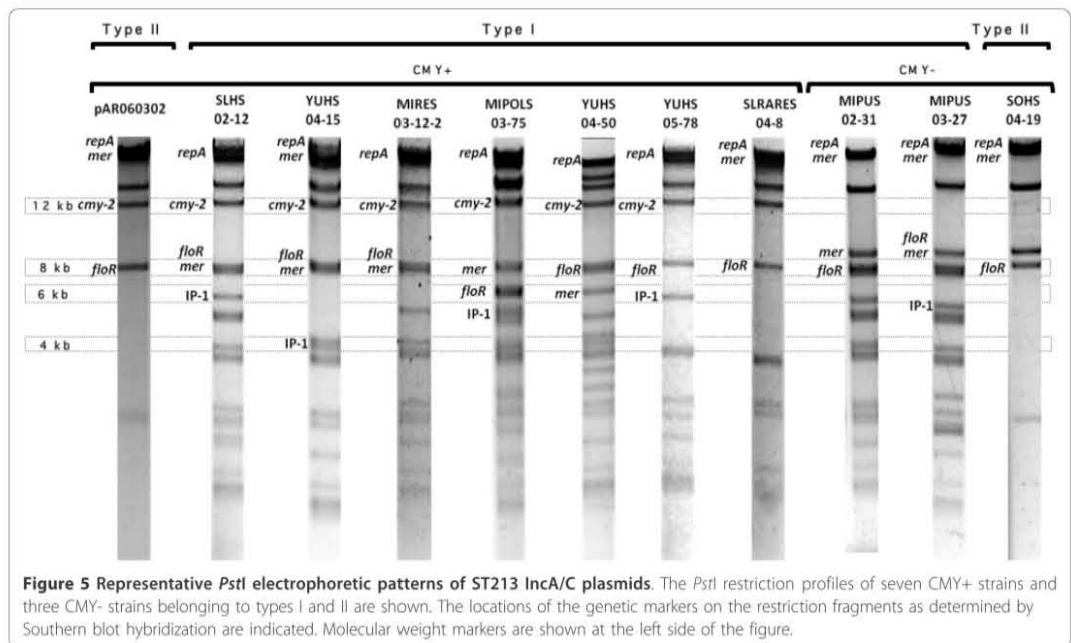


Figure 5 Representative *Pst*I electrophoretic patterns of ST213 IncA/C plasmids. The *Pst*I restriction profiles of seven CMY+ strains and three CMY- strains belonging to types I and II are shown. The locations of the genetic markers on the restriction fragments as determined by Southern blot hybridization are indicated. Molecular weight markers are shown at the left side of the figure.

of the CMY island, such as pAR060302 [6]. The *repA/C* probe hybridized with the larger band in all the strains, which should be about 55 kb according to an *in silico* *PstI* restriction of the complete sequence of pAR060302. This band also hybridized with the *mer* probe for most of the plasmids, in agreement with the *in silico* prediction. However, some polymorphisms were detected using the *mer* probe (Figure 5). The *floR* probe produced a single band of 8 kb, with one exception (Figure 5; MIPOLS 03-75, 7 kb). Finally, hybridizations were performed using the first two genes of IP-1 (*dfr12* and *orfF*); the *aadA* region was not included in the probe because this gene has been associated with other integrons often present in IncA/C plasmids, such as that of transposon Tn21 [7-9]. Most of the strains produced a hybridization band of 6 kb, but there were polymorphisms (Figure 5).

Conjugative transfer of IncA/C plasmids

Ten CMY+ and seven CMY- ST213 isolates were evaluated for conjugative transfer of their A/C plasmids to *E. coli* DH5 α . Transconjugants were only obtained for the CMY+ strain YUHS 05-78 and at a very low frequency (10^{-7} to 10^{-9}), but they were positive for all nine PCR markers of the donor plasmid, which lacked the *mer* region (Figure 2). However, no transconjugants were observed when an *E. coli* strain carrying the YUHS 05-78 CMY+ plasmid was used as the donor. The highest efficiencies were obtained with a donor:recipient ratio of 1:10 and an incubation for 18 hr on a solid medium (see Methods). In our hands, conjugation efficiencies for AR060302 and SN11 strains were in the order of 10^{-5} and 10^{-6} , respectively. Nevertheless, these frequencies were lower than those reported for these plasmids (i.e. 10^{-3}) [6,22].

Discussion

Distribution of IncA/C plasmids within Typhimurium genotypes and across geographic regions

We found an association between the Typhimurium ST213 genotype and large IncA/C plasmids. These plasmids accounted for most of the MDR phenotypes of the strains, and they might be related to the ecological success of this recently emerging clone in Mexico. In a previous study, we reported a trend towards the replacement of the founder ST19 by the derived ST213 in four regions of Mexico. We suggested that the carriage of *bla*_{CMY-2} by some of the ST213 strains could only partially explain their increased prevalence because half of the ST213 strains do not harbour *bla*_{CMY-2}. In the present study, we discovered that the CMY- strains also harbour large IncA/C plasmids with several resistance determinants. The lack of pSTV and the carriage of IncA/C plasmids are remarkable features of the

ST213 genotype in the Mexican Typhimurium population. We speculate that ST213 arose as a clone lacking pSTV and that this condition allowed the acquisition of the large IncA/C plasmids. The success of this association could be due to antimicrobial pressure exerted by human clinical and animal-production practices on the Typhimurium population.

We previously detected several associations among chromosomal genotypes and accessory genes [16], suggesting that the population subgroups generated by these associations could be explained by several evolutionary processes, such as barriers to genetic exchange, genetic drift or recent clonal expansions within the Typhimurium population. The present study reveals the tight association between the ST213 genotype and IncA/C plasmids. Associations between plasmid type and chromosomal genotype have been reported for other *Salmonella* serovars, such as Newport [24,25] and Typhi [26]. Daniels et al. [25] described the relationship between Newport and its plasmids as clonal based on the model proposed by Souza and Eguiarte [3], implying that strong co-evolution may be occurring between the plasmid and the host, with very limited plasmid transfer among bacteria.

The plasmid types appear to cluster geographically. All the Yucatán isolates carry type I plasmids, while all the isolates from Sonora carry only type II plasmids. Isolates from Michoacán and San Luis Potosí harbour plasmids from both types I (CMY+ and CMY-) and II. These patterns demonstrate a distribution gradient of the IncA/C plasmids from the northern (Sonora) to the southern (Yucatán) part of Mexico, with intermediate levels in the middle part of Mexico (Michoacán and San Luis Potosí). This gradient is also related to the higher number of resistances conferred by the type I plasmids than by the CMY- type II plasmids (>6 vs. <6, respectively; Figure 2). These trends provide information for understanding the ecology and epidemiology of the emergent ST213 genotype in Mexico, and they increase our knowledge of the evolution of MDR in Typhimurium.

Mobility of the ST213 IncA/C plasmids

The conjugation frequencies reported for IncA/C CMY+ plasmids are highly variable. Welch et al. [8] reported a lack of transferability for the Newport IncA/C plasmids, while Poole et al. [22] observed conjugation frequencies between 10^{-2} and 10^{-5} , but only when other replicons were present and co-transferred. On the other hand, most studies have reported that Typhimurium plasmids are non-conjugative [23,27] or transfer at moderate frequencies (10^{-3} to 10^{-7}) [8]. In the present study, we found that only one of the IncA/C plasmids tested was able to conjugate, albeit at very low frequencies (10^{-7} to 10^{-9}). The only distinctive feature of this YUHS 05-78,

150 kb CMY+ plasmid is its lack of the *mer* region. It has been suggested that the inability of *Salmonella* CMY+ plasmids to conjugate is due to the insertion of the CMY island into the *tra* operon on the plasmid backbone [22]. However, the conjugative plasmid YUHS 05-78 has the CMY island inserted in between *traA* and *traC*, and this is also true for almost all the other CMY+ plasmids. We think that the reduced conjugative ability of the IncA/C plasmids in *Salmonella* might be due to chromosomally encoded factors, such as the thickness of the cell envelope, rather than to plasmid-encoded features, or it may depend on the presence of additional helper plasmids, as previously suggested [5,8]. The predominant lack of conjugation ability of our IncA/C plasmids agrees with the clonal dissemination trend detected between chromosomal backgrounds and plasmid patterns, as revealed by *XbaI* and *PstI* digests (Figure 2), respectively. This study provides evidence of frequent rearrangements shaping the genetic composition of the IncA/C plasmids harboured by ST213 strains. It is possible that the IncA/C plasmids circulating in Typhimurium were acquired from other *Salmonella* serotypes or other enteric bacteria such as *E. coli*. The higher plasmid diversity and conjugation frequencies of *E. coli* in comparison with *Salmonella* led Daniels et al. [25] to speculate that insertions and deletions that occur during promiscuous plasmid sharing among *E. coli* isolates occasionally result in plasmids that are successful in *Salmonella*. It is possible that this is the scenario in Mexico, where resistance to ceftriaxone was detected in *E. coli* several years prior to that in *Salmonella* (M. Zaidi, unpublished data).

Evolutionary origin of the two IncA/C types

The combined results of the PCR screening and the nucleotide sequence analysis suggest that the IncA/C plasmids from types I and II have a recent common origin and are evolving by the insertion/deletion of DNA stretches rather than by point mutations, in agreement with the conclusions derived from other studies [5,6,8,10]. For example, in this study, insertion of the IP-1 integron (*dfrA12*, *orfF* and *aadA2*) and deletion of the R-8 segment were observed in most of the CMY+ plasmids.

The PCR markers and plasmid sizes of the IncA/C CMY+ reference plasmids of *E. coli* AR060302 [6] and Newport SN11 [22] corresponded with those of our Typhimurium IncA/C CMY+ plasmids. However, their *PstI* restriction profiles were related to type II plasmids, which included most of our Typhimurium IncA/C CMY- plasmids (Figure 2). As the CMY+ reference plasmids and our type II plasmids were found to be similar, we speculate that the ST213 IncA/C CMY+ plasmids diversified from a type II ancestor by the insertion and

deletion of DNA segments such as R-8 and the IP-1 integron, among others. Likewise, hybridization assays showed that this integron mapped to some of the bands that are absent in the type II restriction profiles (Figure 5). Despite the nucleotide identity of the sequenced regions of the CMY- plasmids, and aside from IP-1, they share only three of the ten genetic markers (*repA*, *floR* and *mer*; Figure 2 and Figure 3) that have been used to study the IncA/C plasmids, indicating that they belong to an IncA/C plasmid lineage that has not been thoroughly studied yet. The *floR* allele of the CMY+ and CMY- plasmids was identical to that of pSN254, but the CMY region of the CMY+ plasmids was identical to the region of pAR060302, suggesting a mosaic pattern of ancestry with plasmids from other *Salmonella* serovars and *E. coli*. Moreover, the type II CMY- plasmids were found to be smaller (100 vs. 150-160 kb; Figure 2), consistent with the notion that the CMY+ plasmids are the result of the insertion of DNA modules into a type II precursor plasmid. A formal alternative would be that a substantial loss of DNA fragments originally present in the CMY+ plasmids occurred, giving rise to ST213 type II derivatives. In this respect, it would be necessary to obtain the full sequence of some of our CMY+ and CMY- plasmids to identify their genetic compositions and to unravel their evolutionary histories.

Conclusions

The ecological success of the newly emerging Typhimurium ST213 genotype may be related to the carriage of IncA/C plasmids. Two divergent genetic types of IncA/C plasmids were identified. Type I plasmids are the most abundant and widespread; their genetic compositions are similar to those of other reported IncA/C plasmids. Type II plasmids display a lower number of *PstI* restriction fragments and are smaller than type I plasmids. Only three of the ten plasmid regions analyzed were detected in type II plasmids, even though the nucleotide sequences for these regions were identical for both types. We conclude that type I and II plasmids originated from a common ancestor and that the insertion and deletion of DNA stretches have shaped their evolutionary histories.

Methods

Typhimurium ST213 isolates

The isolates used in the present study were described in a previous publication [16]. Briefly, the isolates were collected from a Mexican surveillance network [28]. The predominant ST213 genotype formed a well-defined group in the dendrogram based on *XbaI* fingerprints (named cluster I), which was subdivided into subclusters Ia, Ib and Ic. The ST213 genotype was associated with the plasmid-borne *bla*_{CMY-2} gene conferring resistance

to extended spectrum cephalosporins and with the integron profile one (IP-1) carrying an array of three cassettes containing the genes *dfr12*, *orfF* and *aadA2* conferring resistance to trimethoprim and streptomycin. These accessory elements were not present in all the isolates: among the 68 ST213 isolates, 31 lacked *bla*_{CMY-2}, 19 did not have IP-1 and 12 lacked both of them. In the present study, a representative sample of 45 isolates was chosen to characterize their IncA/C plasmids. The code labels of the strains were designed to include relevant information about their isolation. The first two letters indicate the state: YU, Yucatán; SL, San Luis Potosí; MI, Michoacán; and SO, Sonora. The third and fourth letters indicate the isolation source: HS, human; PUS, pork meat; RES, beef meat; POLS, chicken meat; RAPUS, pork intestine; and RARES, beef intestine. The first two numbers indicate the year of isolation (from 2002-2007), and the last numbers are the isolate numbers.

Plasmid DNA extraction and plasmid profiles

Plasmid profiles were obtained by a modified alkaline lysis procedure [29] and were visualized by electrophoresis in 0.7% agarose gels subjected to 60 V for 8 hours. Plasmid profiles of *E. coli* V157 [30], *E. coli* E2348/69 [31] and *E. coli* AR060302 [6] were used as molecular markers for large plasmids, and supercoiled DNA ladders (Invitrogen) were used for smaller plasmids. To resolve plasmids larger than 50 kb, we performed S1 restriction PFGE. Briefly, total DNA was embedded in agarose plugs, and slices were treated with 8 U of nuclease S1 (Promega) at 37°C for 45 min. The PFGE running conditions were 6 V/cm at 14°C for 15 hours, and switching times ranged from 1 sec to 25 sec. The Low Range PFG Marker was used as the reference standard (New England Biolabs).

Plasmid transformation and antimicrobial susceptibility testing

Plasmid DNA was introduced into *E. coli* DH5 α and TOP10 through electroporation. Transformants were selected on Luria-Bertani (LB) agar containing either 2- μ g/ml ceftriaxone for the CMY+ isolates or 15- μ g/ml chloramphenicol for the CMY- isolates.

Susceptibility testing was performed by disk diffusion according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations [32]. The following commercially purchased disks (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) were used: ampicillin (A), 10 μ g; chloramphenicol (C), 30 μ g; streptomycin (S), 10 μ g; sulfonamides (Su), 250 μ g; tetracycline (T), 30 μ g; ceftriaxone (Ax), 30 μ g; gentamicin (G), 10 μ g; trimethoprim-sulfamethoxazole (Sxt), 1.25/23.75 μ g; kanamycin (K), 10 μ g; nalidixic acid (N), 30 μ g. Resistance to

ceftriaxone was confirmed by agar dilution using a breakpoint of ≥ 4 μ g/ml.

Plasmid PstI restriction and Southern hybridization

Plasmid restriction analysis with *Pst*I has been used for the classification of CMY+ plasmids according to Giles types [12,20]. Giles type A has been correlated with IncA/C plasmids carrying a single *bla*_{CMY-2} copy, type B with IncI1 plasmids, and type C with IncA/C plasmids carrying two *bla*_{CMY-2} copies [6,19]. Plasmid DNA was treated with 15 U of *Pst*I (Invitrogen) at 37°C for 6 hours and was electrophoresed in 0.7% agarose for 3 hours at 100 V. The *Pst*I digests were transferred to positively charged membranes (Amersham Hybond™ - N⁺) and were hybridized with *bla*_{CMY-2}, *repA*, *floR*, *merA-T* and *dfr12-orfF* PCR products labeled with α -³²P-dCTP by standard methods [29]. Hybridizations were carried out at 65°C.

To determine the genetic relationship between the IncA/C plasmids, *Pst*I restriction profiles were analyzed with GelComparII. Clustering was performed using the UPGMA algorithm based on Dice coefficients. One reference isolate was run on all gels. A stringency parameter of 1.0% band position tolerance was used since this was the point at which the common restriction profile was identical across gels.

PCR assays and nucleotide sequencing

The complete list of primers used in this study is shown in Additional file 1, Table S1. To determine the incompatibility groups of the plasmids, PCR-replicon typing for the *Salmonella* isolates and their *E. coli* transformants was performed using the primers and conditions recommended by Carattoli et al. [21]. The incompatibility groups tested were IncA/C, FII, HI1, HI2 and II.

The *E. coli* transformants carrying the IncA/C plasmids were screened by PCR using primers to detect seven regions distributed throughout the reported IncA/C plasmids [5-8,10] (Figure 3). The primers used are listed in Additional file 1, Table S1, and for a detailed explanation see the legend to Figure 3. The nucleotide sequences of these regions were determined for a representative sample of ten isolates (Additional file 2, Table S2) using the same primers and conditions. Plasmid DNA of the transformants was used for PCR mapping of the CMY island and surrounding regions. Overlapping PCR assays were designed to cover the CMY region using primers previously published [33] or designed by us based on the reported sequence of pSN254 [GenBank:NC_009140] [8]. Nine reactions were designed to determine the configuration at the CMY region (Figure 4, PCRs A-I). PCRs A, B, D and G were included in the plasmid PCR screening scheme to examine the CMY junction of all isolates. The nucleotide

sequence for the 12,563 bp CMY region was generated for isolate YUHS 07-18 [GenBank:HQ203988], which was the most recent representative isolate of ST213. Accession numbers of the nucleotide sequences generated for representative strains (Additional file 2, Table S2) are as follows: *repA/C* [GenBank: HQ203980], *flor* [GenBank: HQ203981], PCR G [GenBank: HQ203982], PCR A [GenBank: HQ203983], R-7 [GenBank: HQ203984], R-8 [GenBank: HQ203985], and two *mer* alleles [GenBank: HQ203986] and [GenBank: HQ203987]. All nucleotide sequences were compared against public databases using the BLAST algorithm at NCBI [34].

Conjugation experiments

We performed conjugation experiments for 17 Typhimurium isolates using a rifampicin (100 µg/ml)-resistant derivative of *E. coli* DH5α as the recipient. We tested several conditions for the conjugation experiments, including a liquid versus solid LB medium, presence of absence of filters, two incubation temperatures (37 and 42°C), several incubation times (from 3 to 48 hrs) and different donor: recipient ratios (1:1, 1:2, 1:5 and 1:10). Conjugations were performed using both the *Salmonella* isolates and their respective *E. coli* transformants. Ceftriaxone (2 µg/ml) and chloramphenicol (15 µg/ml) were used to select for the transfer of CMY+ and CMY- plasmids, respectively. Transfer efficiencies were calculated as the number of transconjugants per donor.

Additional material

Additional file 1: Table S1. Primers used in this study.

Additional file 2: Table S2. Isolates sequenced and GenBank accession numbers.

Acknowledgements

This work was partially funded by research grants from CONACyT/Mexico (No.82383 and No. 60227) and DGAPA/UNAM (No. 216310 and 205107) to EC and Ricardo Oropeza; by a Ph.D. fellowship from CONACyT (No. 214945) to MW; and by a postdoctoral fellowship to CS from CONACyT (No. 60796). We are grateful to all the people that kindly supplied reference strains: *E. coli* V157 was provided by Francis L. Macrina, *E. coli* AR060302 was provided by Douglas R. Call, Newport SN11 was provided by Toni L. Poole and Dayna Harhay, and *E. coli* E2348/69 was provided by Alejandro Huerta. We appreciate the technical assistance of Elvira Villa; the administrative support of Amapola Blanco and Rosalva González; and the primer synthesis and sequencing service given by Eugenio López, Santiago Becerra, Paul Gaytán and Jorge Yañez at the Instituto de Biotecnología, UNAM. Rafael Díaz (CCC, UNAM) and Cindy Dierikx (Central Veterinary Institute, the Netherlands) helped us with the S1 PFGE protocol.

Author details

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México. ²Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México. ³Hospital General O'Horan y Hospital Regional de Alta Especialidad de la Península de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Authors' contributions

MW and CS conceived the study, performed most of the laboratory work, analyzed and interpreted the data and drafted the manuscript. EC participated in the conception of the study, the interpretation of the data and helped to draft the manuscript. MFM designed the mapping strategy for the CMY region and helped in the laboratory work. MAC participated in the interpretation of data and helped to draft the manuscript. FC performed the antimicrobial susceptibility testing. MBZ provided the strains, helped in the initial conception of the study and in drafting the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 10 September 2010 Accepted: 11 January 2011

Published: 11 January 2011

References

1. Levin BR, Bergstrom CT: Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**:6981-6985.
2. Heuer H, Abdo Z, Smalla K: Patchy distribution of flexible genetic elements in bacterial populations mediates robustness to environmental uncertainty. *FEMS Microbiol Ecol* 2008, **65**:361-371.
3. Souza V, Eguilarte LE: Bacteria gone native vs. bacteria gone awry?: plasmidic transfer and bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**:5501-5503.
4. Couturier M, Bex F, Bergquist P, Maas WK: Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev* 1988, **52**:375-395.
5. Fricke WF, Welch TJ, McDermott PF, Mammel MK, LeClerc JE, White DG, Cebula TA, Ravel J: Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *J Bacteriol* 2009, **191**:4750-4757.
6. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, Herndon DR, Kappmeyer LS, Daniels JB, Besser TE: blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:590-596.
7. McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, et al: Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**:1221-1228.
8. Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, Mammel MK, Eppinger M, Rosovitz MJ, Wagner D, et al: Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE* 2007, **2**:e309.
9. Pan JC, Ye R, Wang HQ, Xiang HQ, Zhang W, Yu XF, Meng DM, He ZS: *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:3829-3836.
10. Kim MJ, Hirono I, Kurokawa K, Maki T, Hawke J, Kondo H, Santos MD, Aoki T: Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R Plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**:606-611.
11. Bauernfeind A, Stemplinger I, Jungwirth R, Giamarellou H: Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, **40**:221-224.
12. Carattoli A, Tosini F, Giles WP, Rupp ME, Hinrichs SH, Angulo FJ, Barrett TJ, Fey PD: Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:1269-1272.
13. Zhao S, White DG, McDermott PF, Friedman S, English L, Ayers S, Meng J, Maurer JJ, Holland R, Walker RD: Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**:3647-3650.
14. Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A: Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:3203-3206.

15. Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ: **Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:1908-1915.
16. Wiesner M, Zaidi MB, Calva E, Fernandez-Mora M, Calva JJ, Silva C: **Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:131.
17. **Salmonella MLST database.** [http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica].
18. Zaidi MB, Leon V, Canche C, Perez C, Zhao S, Hubert SK, Abbott J, Blickenstaff K, McDermott PF: **Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant bla_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:398-401.
19. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinson C, Villa L, Whichard JM, Rossolini GM: **Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams.** *Emerg Infect Dis* 2006, **12**:1145-1148.
20. Giles WP, Benson AK, Olson ME, Hutkins RW, Whichard JM, Winokur PL, Fey PD: **DNA sequence analysis of regions surrounding bla_{CMY-2} from multiple *Salmonella* plasmid backbones.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2845-2852.
21. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ: **Identification of plasmids by PCR-based replicon typing.** *J Microbiol Methods* 2005, **63**:219-228.
22. Poole TL, Edrington TS, Brichta-Harhay DM, Carattoli A, Anderson RC, Nisbet DJ: **Conjugative Transferability of the A/C Plasmids from *Salmonella enterica* Isolates That Possess or Lack bla_{CMY} in the A/C Plasmid Backbone.** *Foodborne Pathog Dis* 2009, **11**:185-1194.
23. Winokur PL, Brueggemann A, DeSalvo DL, Hoffmann L, Apley MD, Uhlenhopp EK, Pfaller MA, Doern GV: **Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:2777-2783.
24. Zhao S, McDermott PF, Friedman S, Abbott J, Ayers S, Glenn A, Hall-Robinson E, Hubert SK, Harbottle H, Walker RD, et al: **Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS retail meat surveillance.** *Foodborne Pathog Dis* 2006, **3**:106-117.
25. Daniels JB, Call DR, Besser TE: **Molecular epidemiology of bla_{CMY-2} plasmids carried by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from cattle in the Pacific Northwest.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:8005-8011.
26. Phan MD, Kidgeell C, Nair S, Holt KE, Turner AK, Hinds J, Butcher P, Cooke FJ, Thomson NR, Titball R, et al: **Variation in *Salmonella enterica* serovar typhi IncHI1 plasmids during the global spread of resistant typhoid fever.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**:716-727.
27. Su LH, Chen HL, Chia JH, Liu SY, Chu C, Wu TL, Chiu CH: **Distribution of a transposon-like element carrying bla_{CMY-2} among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:424-429.
28. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G, Lopez E, Contreras J, Abbott J, Zhao S, et al: **Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**:429-435.
29. Sambrook J, Russell DW: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
30. Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM: **A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules.** *Plasmid* 1978, **1**:417-420.
31. Iguchi A, Thomson NR, Ogura Y, Saunders D, Ooka T, Henderson IR, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, et al: **Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69.** *J Bacteriol* 2009, **191**:347-354.
32. NCCLS: **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Document M2-A7.** Book Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Document M2-A7 (Editor ed. eds.), Approved Standard- Seventh Edition edition. City 2000.
33. Kang MS, Besser TE, Call DR: **Variability in the region downstream of the bla_{CMY-2} beta-lactamase gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* plasmids.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:1590-1593.
34. **National Center for Biotechnology Information.** [http://www.ncbi.nlm.nih.gov].

doi:10.1186/1471-2180-11-9

Cite this article as: Wiesner et al: *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiology* 2011 **11**:9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional file 1. Table S1. Primers used in this study.

Assay	Primer	Region	Sequence 5'– 3'	Size bp	Source
Replicon typing					
	repA-F	IncA/C	GAG AAC CAA AGA CAA AGA CCT GGA	300	[4]
	repA-R		TTC TGG AGT TCG TAC AGA GTG AAC		[4]
	FII-F	IncFII	CTG TCG TAA GCT GAT GGC	270	[2]
	FII-R		CTC TGC CAC AAA CTT CAG C		[2]
	HI2-F	IncHI2	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C	644	[2]
	HI2 -R		GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T		[2]
	I1-F	IncI1	CGA AAG CCG GAC GGC AGA A	139	[2]
	I1-R		TCG TCG TTC CGC CAA GTT CGT		[2]
PCR screening					
repA/C	A/C-F	IncA/C	ACT GAA TTC GCG AAA CTG GGG AAA TGT G	2,589	This study
	A/C-R		TGT GTC GAC GGT TCG TTC GTT GCG TTT CA		This study
	A/C-seq		CGC AAG AAA GGC GGG AAC GCC AGG TGC		This study
<i>floR</i>	<i>floR</i> -F	<i>floR</i>	CCGCGTGGGCCTATACGCTG	1,100	This study
	<i>floR</i> -R		GAGCCGAAGGAGCACCAGCC		This study
Region 7	R7F	R-7	CAG CAC AAA CAT CTT CCC AGA C	1,431	[4]
	R7R		GGG TAA CAC CGC CAA CTC TTA C		[4]
Region 8	R8F	R-8	GAA AGC GCA ACA ACA CAA AGA C	1,600	[4]
	R8R		TGA CTA CTC TTG CCA GCT TTG C		[4]
<i>mer</i>	<i>merA2</i>	<i>merAPT</i>	AAG GTC TGS GCC GCR AGC TTC	2,185	[5]
	<i>merA1</i>		ACC ATC GGC GGC ACC TGC G		[5]
	<i>merT1</i>		TCT GAT CGC CCT GGG GTT		[5]
	<i>merA-F</i>		TGATCCCTTCGGCACCAGG		This study
integron	CS-F	integron	GGC ATC CAA GCA GCA AG	2,000	[1]
	CS-R		AAG CAG ACT TGA CCT GA		[1]
	orfF-R		CTTGCTACGCAAGGGCTAG		This study
CMY region					
PCR A	<i>traV</i> -F	<i>traV-tnpA</i>	ATGAAAAATTTGAACATTTTGACCAG	1,900	This study
	<i>TnpA2</i> -L		TAGCCACTATCCATTCGAAATAAAA		[3]
PCR B	<i>traV</i> -F	<i>traV- traA</i>	ATGAAAAATTTGAACATTTTGACCAG	1,900	This study
	<i>traA</i> -R				This study
PCR C	<i>TnpA1</i> -L	<i>tnpA-blc</i>	ATCAGCTTTTATGACTCGAT	3,449	[3]
	<i>Blc</i> -R		ATTGGTCTGAAGCTGAGCACT		[3]
PCR D	<i>sugE</i> -F	<i>blc</i> -Hyp	GGGTGAAACAGCCTGGCGCT	1,497	This study
	<i>Hyp</i> -R1		AGGTTGGCGGCGTCACATCG		This study
PCR E	<i>Hyp</i> -F1	<i>Hyp</i>	CGATGTGACGCCCCAACCT	2,331	This study
	<i>Hyp</i> -R2		CCGTCACCACTGAACAGG		This study
PCR F	<i>Hyp</i> -F2	<i>Hyp-dsbC</i>	TTCCAAGGTAAAAGTTGGGTCTG	2,763	This study
	<i>dsbC</i> -R		GGCTTTGAGAGGAATGAACCTTA		This study

PCR G	dsbC-F traC-R	<i>dsbC-traC</i>	TAAGGTTTCATTCTCTCAAAGCC GGTGCCGTAATCGAAGATTT	1,542	This study [3]
PCR H	TnpA2-L Blc-R	<i>blc-tnpA</i>	TAGCCACTATCCATTTCGAAATAAAA ATTGGTCTGAAGCTGAGCACT	3,255	[3] [3]
PCR I	TnpA2-L CMY-R	<i>bla_{CMY-2}- tnpA</i>	TAGCCACTATCCATTTCGAAATAAAA CAG TAG CGA GAC TGC GCA	2,298	[3] [6]

References.

1. Levesque, C., Piche, L., Larose, C., and Roy, P. H., *PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes*. Antimicrob. Agents Chemother., 1995. **39**:185-191.
2. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., and Threlfall, E. J., *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. J. Microbiol. Methods, 2005. **63**:219-228.
3. Kang, M. S., Besser, T. E., and Call, D. R., *Variability in the region downstream of the bla_{CMY-2} beta-lactamase gene in Escherichia coli and Salmonella enterica plasmids*. Antimicrob. Agents. Chemother., 2006. **50**:1590-1593.
4. Welch, T. J., Fricke, W. F., McDermott, P. F., White, D. G., Rosso, M. L., Rasko, D. A., Mammel, M. K., Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Wagner, D., Rahalison, L., Leclerc, J. E., Hinshaw, J. M., Lindler, L. E., Cebula, T. A., Carniel, E., and Ravel, J., *Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk*. PLoS ONE, 2007. **2**:e309.
5. McIntosh, D., Cunningham, M., Ji, B., Fekete, F. A., Parry, E. M., Clark, S. E., Zalinger, Z. B., Gilg, I. C., Danner, G. R., Johnson, K. A., Beattie, M., and Ritchie, R., *Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the Salmonella enterica plasmid pSN254*. J. Antimicrob. Chemother., 2008. **61**:1221-1228.
6. Wiesner, M., Zaidi, M. B., Calva, E., Fernandez-Mora, M., Calva, J. J., and Silva, C., *Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican Salmonella enterica serovar Typhimurium strains*. BMC Microbiol., 2009. **9**:131.

Table S2. Isolates sequenced and GenBank accession numbers.

Isolate	Year, source and State ^a	CMY island	<i>PstI</i> cluster	Region sequenced (bp)						
				<i>repA/C</i>	<i>floR</i>	PCR A	PCR G	R-7	R-8	<i>mer</i>
				(2,412)	(1,080)	(1,342)	(1,790)	(1,331)	(1,540)	(2,179)
				HQ203980	HQ203981	HQ203983	HQ203982	HQ203984	HQ203985	HQ203986
YUPUS 03-32-1	2003, PM, YU	+	a	+	+	+	+	+	-	+
YUHS 04-15	2004, HE, YU	+	a	+	+	+	+	+	+	+
YUHS 05-78	2005, HS, YU	+	a	+	+	+	+	+	-	-
YUHS 07-18	2007, HE, YU	+	a	+	+	+	+	+	-	+
MIPOLS 03-75	2003, CM, MI	+	a	+	+	-	-	+	+	+
SLRARES 04-8	2004, BI, SL	+	b	+	+	+	+	+	+	+
MIPUS 03-27	2003, PM, MI	-	b	+	+	-	-	-	-	+
SLRAPUS 04-6	2004, SI, SL	+	na	+	+	+	+	+	+	+
YUHS 03-19	2003, HE, YU	+	d	+	+	+	+	+	+	+
SORES 04-45	2004, BM, SO	-	e	+	+	-	-	-	-	+

^a YU, Yucatán; SL, San Luis Potosí; MI, Michoacán; SO, Sonora; PM, pork meat; HE, human enteric; HS, human systemic; CM, chicken meat; BI, beef intestine; BM, beef meat.
na, not applicable, this strain was not grouped in a cluster (see Fig. 2).

6 El pA/C es compatible con el pSTV y es movilizado por el pX1 durante la conjugación.

Tercera parte de este estudio.

El objetivo inicial de esta tercera parte del estudio era el de determinar si la presencia del pSTV en una cepa ST 19 era un factor de incompatibilidad o una barrera de entrada para el pA/C, y que pudiera explicar la segregación que observamos en las cepas de campo.

Sin embargo, los resultados obtenidos nos confirman que estos dos plásmidos son compatibles y estables, tanto en cepas de *E. coli* de laboratorio como en cepas de Typhimurium de campo. Por otro lado, mediante experimentos de conjugación descubrimos que la movilidad del pA/C depende de su co-existencia con un plásmido altamente conjugativo del grupo IncX1. De esta manera, en las siguientes secciones de la tesis se detallan los aspectos de esta parte del trabajo doctoral, cuyo manuscrito para publicación se encuentra actualmente en proceso. Igualmente la hipótesis y objetivos presentados a continuación, corresponden a la tercera parte de este trabajo.

7 Hipótesis.

La capacidad conjugativa del pA/C CMY+ es muy baja y por ello su transferencia horizontal es limitada.

8 Objetivo general.

Caracterizar la capacidad conjugativa del pA/C en los aislados de Typhimurium ST 213 y la compatibilidad de los plásmidos pA/C y pSTV.

9 Objetivos específicos.

1. Determinar si el pA/C y el pSTV son incompatibles mediante transformación.
2. Evaluar la estabilidad del pA/C y pSTV durante varias generaciones.
3. Evaluar la capacidad de conjugación del pA/C a *Salmonella* Typhimurium y a cepas de *E. coli* de laboratorio.

10 Materiales y Métodos

10.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.

- Cepas donadoras en conjugación: se utilizó la cepa silvestre YU39 (YUHS 05-78) (Wiesner et al., 2009) que contiene cinco plásmidos: el pA/C de 150 Kb (referido en adelante como el YU39pA/C), el p100 de 100 Kb, el pX1 de 35 Kb, el pColE1-like de 5 Kb y el p3 de 3 Kb (referido en adelante como YU39pA/C). Para obtener el pA/C silvestre, se electroporó a *E. coli* DH5 α como se describió previamente (Wiesner et al., 2011) y la cepa resultante (D-pA/C) se utilizó como donadora. Para el pSTV, se escogió la cepa SO1 (SOHS 02-2), a la cual le reemplazamos el gen *spvC* del plásmido con un casete de kanamicina KM (SO1pSTV*spvC*::*Km*) (Datsenko & Wanner, 2000). Los pA/C transconjugantes se electroporaron a *E. coli* DH5 α , y se utilizaron como donadoras en las segundas rondas de conjugación. Estas cepas se nombraron D-pA/C-(clave transconjugante) (ver siguiente sección). Las mutantes pX1*ydgA*::*Tn5*, pX1*ydfA*::*Km* y pX1*taxB*::*Km* se usaron como donadoras en la conjugación del pX1. También se utilizaron como donadoras las cepas DH5 α con los dos plásmidos: D-pA/C pX1*ydgA*::*Tn5*, D-pA/C pX1*ydfA*::*Km* y D-pA/CpX1*taxB*::*Km*.

- Cepas receptoras en conjugación: se utilizaron las cepas Typhimurium ST 19 llamadas LT2 (McClelland et al., 2001) y SO1 (SOHS 02-2) (Wiesner et al., 2009) que portan el pSTV*spvC*::*Km* y la cepa YU39 mencionada en la sección anterior como receptora. Se utilizaron diferentes cepas de laboratorio de *E. coli* como DH5 α , HB101 y HB101pSTV(*spvC*::*Km*). Para su selección, se seleccionaron mutantes espontáneas de las receptoras a rifampicina (RIF 50 μ g/mL) y ácido nalidíxico (NAL 30 μ g/mL).

En la Tabla 1 se puede observar un listado de todas las cepas empleadas en este estudio.

En la Figura 4 se puede observar el esquema de las conjugaciones realizadas.

10.2 Prueba de incompatibilidad.

El pSTV de la cepa SO1 se introdujo por electroporación a *E. coli* DH5 α y las transformantes se seleccionaron con kanamicina (30 μ g/mL). La presencia del pSTV*spvC*::*Km* se confirmó mediante la amplificación de los genes *spvC*::*Km* y *traT* (Wiesner et al., 2009), además de su visualización en el perfil de plásmidos. Esta cepa luego se utilizó como receptora para la electroporación del pA/C. Como antibiótico de entrada se utilizó CRO (2 μ g/mL). Se evaluó la presencia del pSTV*spvC*::*Km* de la misma forma mencionada anteriormente, y la presencia del pA/C mediante la amplificación del gen *repA/C* y el gen R-7 (Wiesner et al., 2011). Posteriormente, la cepa D-pSTV*spvC*::*Km*-pA/C se creció con KM y CRO para confirmar la presencia de los plásmidos, además de la visualización mediante perfil de plásmidos usando un protocolo modificado de lisis alcalina (Sambrook & Russell, 2001).

De igual manera, se evaluó la presencia del SO1pSTV*spvC*::*Km* en la cepa YU39 WT y del pA/C en la cepa SO1.

10.3 Curvas de estabilidad.

Los experimentos de estabilidad se realizaron por triplicado, a partir de tres colonias aisladas de la D-pSTV $spvC::Km$ -pA/C. Las colonias se incubaron toda la noche en 5 mL de LB con la concentración mencionada anteriormente de CRO y KM, en agitación constante a 37°C. Posteriormente, los cultivos se lavaron dos veces en 1 mL de PBS 1X y se llevaron al mismo volumen final. De esta suspensión celular, se inocularon 100 μ L en 100 mL de LB sin antibiótico, y se incubó a 37°C en agitación constante (200 rpm) por 24 horas. Este cultivo se tomó como el punto cero.

Posteriormente, el cultivo se refrescó cada 24 horas inoculando 100 μ L del ON (overnight o cultivo de toda la noche), en 100 mL de LB estéril sin antibiótico. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar 72 horas (80 generaciones aprox.). Se determinaron las unidades formadoras de colonia (UFC) para las 0, 24, 48 y 72 horas. En cada uno de los puntos se aislaron 100 colonias en cajas de LB sin antibiótico, LB-KM (60 μ g/mL) y LB-CRO (2 μ g/mL) para determinar el porcentaje de células libres de plásmidos en la población.

De las 100 colonias picadas en cada punto, se tomaron dos colonias al azar para evaluar por PCR la presencia de los plásmidos. Para el pA/C se evaluaron los genes *repA/C* y *bla_{CMY-2}*, mientras que para el pSTV se evaluaron los genes *spvC* y *traT* (Wiesner et al., 2011).

El número de generaciones por cepa se calculó mediante curvas de crecimiento por triplicado en 100 mL de LB a 37°C en agitación constante. Se midió la absorbancia (Ab) cada hora a una densidad óptica de 600 nm. Posteriormente se tomó el punto inicial y final de la fase exponencial (Ab1 y Ab2) y la recta se ajustó aplicando una regresión lineal. Esos datos fueron reemplazados en la siguiente fórmula:

$$\mu = \log(t_2/t_1) / Ab_2 - Ab_1$$
$$g = \log 2 / \mu$$

en donde μ es el aumento de la masa celular y g es el tiempo de duplicación, el cual se utilizó como número de generaciones en las gráficas.

10.4 Experimentos de conjugación

Las cepas donadora y receptora se crecieron en 5 mL de LB con el respectivo antibiótico de selección durante toda la noche, en agitación constante a 37°C. Luego, estos cultivos se lavaron dos veces con PBS 1X y se ajustaron a un volumen final de 1 mL. La mezcla donadora-receptora se realizó en una proporción 1:10, sobre agar TSG sin antibiótico, durante 18 horas a 37°C. Las transconjugantes se recuperaron en 2 mL de PBS 1X y se seleccionaron en agar TSG con KM (30 μ g/ μ L), RIF (100 μ g/ μ L), NAL (30 μ g/ μ L) para el pSTV y para el pX1; CRO (2 μ g/ μ L), RIF, NAL para los pA/C; y CRO, KM, RIF, NAL para los co-integrados. La eficiencia de conjugación se calculó como número de transconjugantes sobre número de donadoras. La primera ronda de conjugación se realizó a partir de la YU39pA/C a las receptoras mencionadas anteriormente (ver sección de cepas bacterianas, Tabla 1). La segunda ronda de conjugación se realizó con las D-pA/C transconjugantes hacia la cepa *E. coli* DH5 α y nuevamente hacia la cepa receptora original, la cual se denominó como “estricta” por el hecho de regresar el plásmido a su receptora original. Estos experimentos se repitieron cuatro veces para el pSTV y para la primera ronda de conjugación del pA/C. Las

segundas rondas de los pA/C y las restantes conjugaciones se repitieron por duplicado. Para las transconjugantes resultantes del pA/C se utilizó la siguiente nomenclatura: cada repetición se nombró con el número romano del I al IV; cada receptora se nombró con letras mayúsculas del alfabeto SO1 (A), HB101 (C), HB101pSTV (D), LT2 (E) y finalmente se asignó un número de colonia. De esta forma, cada transconjugante se identificó con una clave de tres dígitos Ejs: IA4, IVC8, IIIE9.

10.5 Caracterización de las transconjugantes.

Los perfiles de plásmidos de cada una de las transconjugantes se visualizaron por Eckhardt y lisis alcalina con modificaciones. Las colonias se evaluaron por PCR para la presencia del pA/C y el pSTV según lo descrito anteriormente (Wiesner et al., 2011). La presencia del pX1 se evaluó mediante la amplificación por PCR de los genes *oriX1*, *Tiso*, *taxB*, *taxC* y *ddp3* (Tabla S1). Los plásmidos D-pA/C silvestre, D-pX1 y D-pA/C transconjugantes se digirieron con 15U de *PstI* por 6 horas a 37°C y con 10U de *BamHI* y *NcoI* por 3 horas a 37°C. Los pSTV se analizaron con la enzima *HindIII* (Chu et al., 1999). Se visualizaron los perfiles de restricción por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% durante 3 horas a 100 V. Para los experimentos posteriores se escogieron 11 transconjugantes que mostraron tamaños diferentes de pA/C.

10.6 Hibridaciones

Todas las sondas se marcaron con α -³²P-dCTP, según la metodología reportada (Sambrook & Russell, 2001). Los perfiles de plásmidos de las cepas donadoras y receptoras, así como los perfiles de restricción de los pA/C, se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente y se hibridaron en experimentos individuales con los plásmidos marcados D-pA/C, D-pA/C-IA9, D-pA/C-III4 y con el D-pX1. También se utilizaron las sondas *spvC* para detectar el pSTV y *mobB* para el pColE1-like.

10.7 Caracterización del pX1

Para el tamizaje del pX1 en los pA/C co-integrados, se escogieron cinco genes conservados en los plásmidos pX1 reportados (Norman et al., 2008, Ong et al., 2009). Dos genes del esqueleto del plásmidos: *oriX1* para confirmar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos y el gen que *ydgA* que codifica para la topoisomerasa III; y tres genes importantes para la conjugación: *taxB* que codifica para la proteína *acopladora* T4CP en conjugación, *taxC* que codifica para la relaxasa y el gen *ddp3* exclusivo de este grupo IncX, que incrementa la frecuencia de conjugación (Nuñez et al., 1997).

10.8 Mutantes en pX1

El plásmido pX1 presente en la cepa YU39 no posee genes de resistencia para su selección. Por consiguiente, la manera de separarlo fue mediante conjugación a una *E. coli* DH5 α seleccionando con los marcadores RIF NAL de la receptora. Posteriormente, 20 colonias se tamizaron mediante lisis alcalina y por PCR para los marcadores del pX1 mencionados anteriormente. Se encontraron 10 colonias positivas para el pX1. Se seleccionó una de estas colonias para la realización de dos mutantes: 1) mediante transposición al azar con el EZ-Tn5™

<KAN-2>Tnp (EPICENTRE®, Madison, Wisconsin) siguiendo las recomendaciones del fabricante. 2) Mediante reemplazo de los genes *ydfA* y *taxB* con un casete de KM según la metodología reportada (Datsenko & Wanner, 2000). Las mutantes obtenidas se electroporaron a *E. coli* DH5α y se denominaron D-pX1*ydgA*::*Tn5*, D-pX1*ydfA*::*Km* y D-pX1*taxB*::*Km*. Se confirmó la inserción del EZ-Tn5™, así como la ausencia de los genes mutados mediante PCRs y secuenciación, de acuerdo a lo sugerido en los protocolos.

10.9 Secuenciación del pColE1-like.

El pColE1-like de la cepa YU39 se purificó de banda y se electroporó a una cepa *E. coli* TOP10. Posteriormente, se realizaron digestiones parciales del pColE1-like con 1U de la enzima *Sau3A*. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el sitio BamHI del vector pUC18 y se seleccionaron las colonias positivas mediante coloración por X-gal. El fragmento clonado se verificó en un gel de agarosa al 1% y se enviaron a secuenciación utilizando los oligos lacZ-F y lacZ-R del vector, en la unidad de secuenciación del IBt-UNAM. Como resultado el fragmento clonado mostró homología con el gen *mobB* de los plásmidos ColE1. Posteriormente y anclándose en la secuencia resultante, los fragmentos faltantes se cerraron mediante la metodología Walking-PCR con los oligos de la Tabla S1. Las secuencias obtenidas se compararon mediante blastn y blastp. El ensamble de las secuencias y anotación de los ORFs, se realizó con el software CLC genomics workbench 4.

La lista de todos los oligos utilizados en este estudio se encuentra en la Tabla S1.

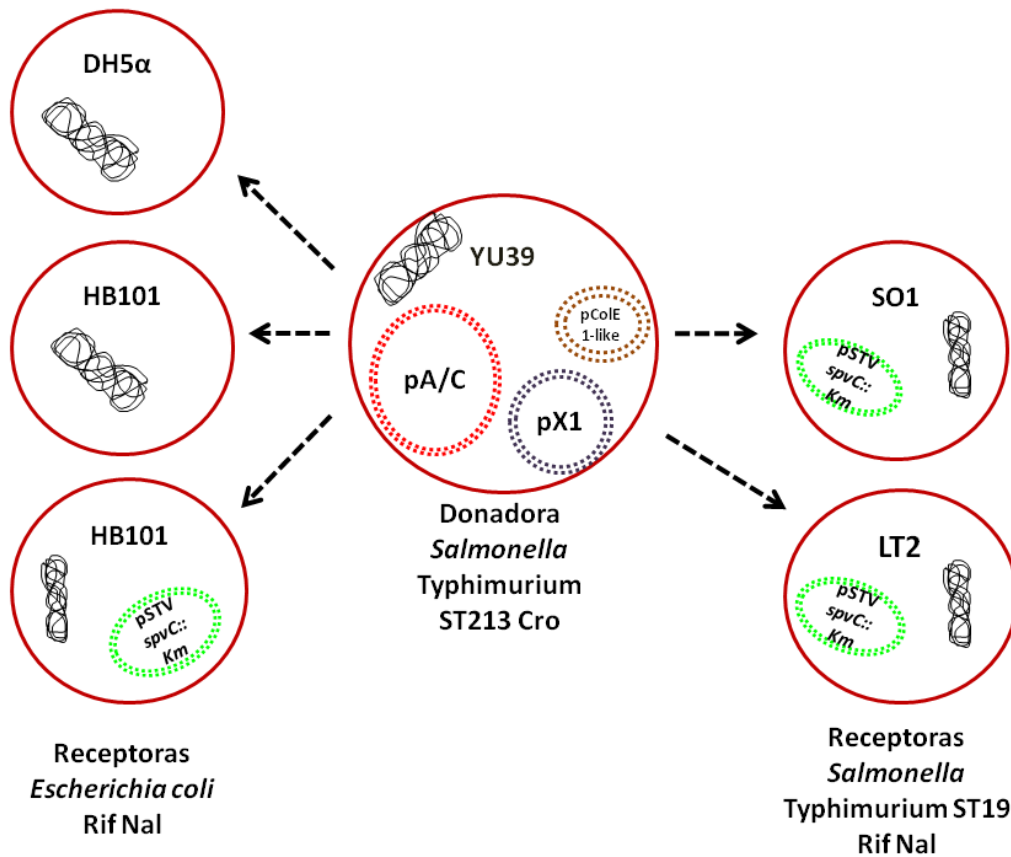


Figura 4. Esquema de conjugación para la cepa donadora YU39. Se utilizaron como receptoras del pA/C, dos cepas de Typhimurium ST 19 que portan el pSTV marcado con resistencia a kanamicina. La cepa SO1 es un aislamiento recuperado de un caso de gastroenteritis en el Estado de Sonora. La cepa LT2 es la cepa de referencia para Typhimurium la cual se encuentra secuenciada (McClelland et al., 2001). Como receptoras control se utilizaron las cepas de *E. coli* DH5α, HB101 y HB101 con el pSTV de la SO1. Los experimentos de conjugación se repitieron cuatro veces para cada receptora. Los círculos punteados corresponden a los plásmidos presentes en cada cepa: pA/C (rojo), pX1 (azul), pColE1-like (café) y pSTV (verde).

Tabla 1. Cepas silvestres, transformantes y mutantes utilizadas en este estudio.

	ST	Cepa	Plásmido	Resistencia ^b
<i>Salmonella</i> Typhimurium	213	YU39 (YUHS05-78)	pA/C	CRO, TET, STR, CHL
	19	SO1 (SOHS 02-2)	pSTVspvC::Km	AMP, KM, RIF ^c , NAL ^c
		LT2	pSTVspvC::Km	KM, RIF ^c , NAL ^c
<i>Escherichia coli</i>	/ ^a	HB101	- ^d	STR, RIF ^c , NAL ^c
		HB101	pSTVspvC::Km	STR, KM, RIF ^c , NAL ^c
		DH5α	-	RIF ^c , NAL ^c
Transformantes	/	D-pSTVspvC::Km-pA/C	pSTVspvC::Km- pA/C	KM, CRO, TET, STR, CHL
	/	D-pA/C	pA/C	CRO, TET, STR, CHL
		221-1		
		221-10		
		225-1		
		225-7		
		D-pA/C-IA4		
		D-pA/C-IA5		
		D-pA/C-IA9		
		D-pA/C-IIIA4		
		D-pA/C-IIIC9		
		D-pA/C-IVC8		
		D-pA/C-IIID8		
	D-pA/C-IVD2			
	D-pA/C-IIIE9			
Mutantes	/	pX1ydgA::Tn5	pX1	KM
		pX1ydfA::Km		
		pX1taxB::Km		
		D-pA/C-pX1ydgA::Tn5	pA/C-pX1	CRO, TET, STR, CHL, KM
		D-pA/C-pX1ydfA::Km		
		D-pA/C- pX1taxB::Km		

^a No determinado. ^b CRO: ceftriaxona, TET: tetraciclina, STR: estreptomicina, CHL: cloranfenicol, RIF: rifampicina, KM: kanamicina, NAL: ácido nalidíxico. ^c mutantes espontaneas. ^d sin plásmido.

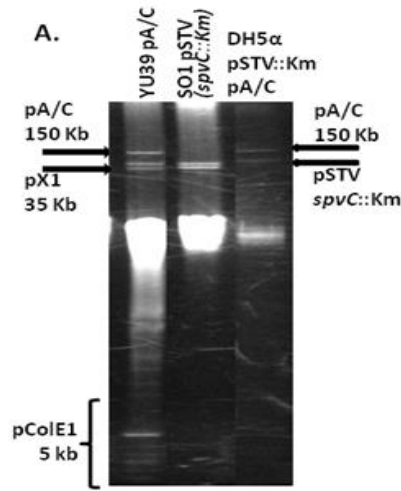
11 Resultados

11.1 El pSTV y el pA/C son compatibles y estables en *E. coli* DH5 α y en una cepa Typhimurium ST213.

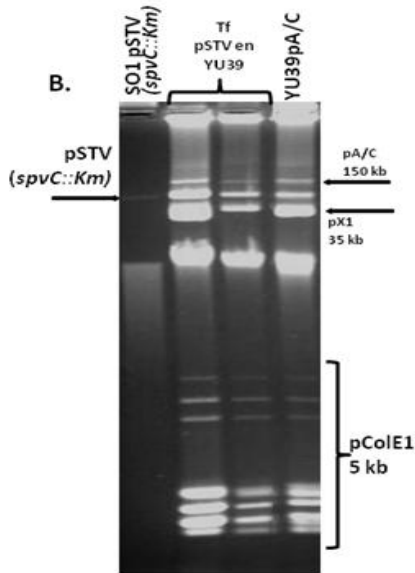
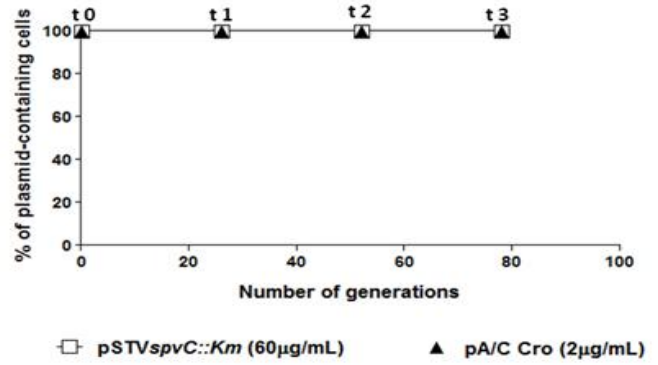
Hasta la fecha no se ha reportado que el pSTV y el plásmido pA/C coexistan en una misma cepa de Typhimurium. Por tal razón primero evaluamos si estos dos plásmidos son compatibles. Para esto, introdujimos por transformación los dos plásmidos en una cepa *E. coli* DH5 α y en la cepa Typhimurium YU39 ST 213, seleccionando con el antibiótico del plásmido entrante y posteriormente evaluamos su estabilidad hasta por 80 generaciones. Como resultado observamos que los dos plásmidos son compatibles. Esto se confirmó mediante PCR y perfil de plásmidos (Figura 5). Sin embargo, no se obtuvieron transformantes del pA/C en la cepa SO1pSTVspvC::Km; probablemente porque este plásmido ha mostrado bajas eficiencias de transformación aún en *E. coli* DH5 α , lo cual estaría acentuado en SO1.

11.2 El pSTV de SO1 es conjugativo.

Se ha reportado que el pSTV de las cepas Typhimurium LT2 y 14028 es conjugativo a frecuencias de 10^{-4} , sin embargo el de la cepa SL1344 no lo es (Ahmer et al., 1999). Por lo tanto, era importante determinar si en nuestra población de Typhimurium el pSTV posee la capacidad de auto-transferirse. Para esto utilizamos como donadora la cepa SO1pSTVspvC::Km y como receptoras la cepas *E. coli* DH5 α y la cepa YU39pA/C. Como resultado observamos que el pSTVspvC::Km se conjugó exitosamente a la cepa *E. coli* DH5 α a una frecuencia de 10^{-6} mientras que fue indetectable en la cepa YU39pA/C.



Stability of pSTV and pA/C in *E. coli* DH5α



Stability of pSTV and pA/C in Typhimurium ST213

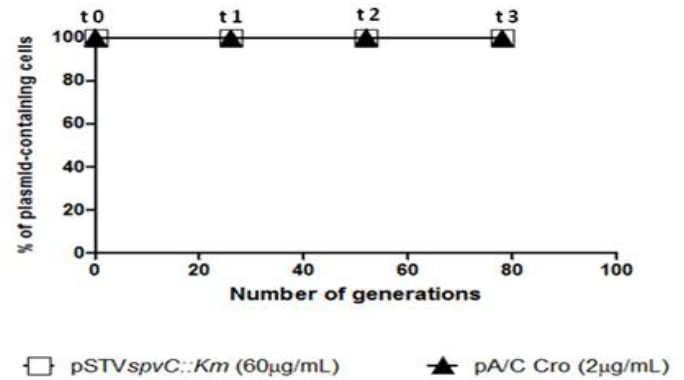


Figura 5. Prueba de compatibilidad y estabilidad entre el pSTV y el pA/C. A) Perfil de plásmidos de las donadoras YU39pA/C, SO1pSTV y la transformante resultante D-pSTVspvC::Km-pA/C. Carril 1: Donadora YU39pA/C. Se puede observar el plásmido pA/C, el pX1 y el plásmido pColE1-like. Carril 2. Donadora SO1pSTVspvC::Km. Carril 3: D-pSTVspvC::Km-pA/C. Curva de estabilidad de la D-pSTVspvC::Km-pA/C. B) Perfil de plásmidos de las donadoras YU39pA/C, SO1pSTV y las transformantes resultantes en ST213. Carril 1: Donadora SO1pSTVspvC::Km. Carril 2 y 3: transformante YU39pA/C y el pSTVspvC::Km. Carril 4: Donadora YU39pA/C. Curva de estabilidad de las transformantes YU39pA/C ST 213 con los dos plásmidos.

11.3 El YU39pA/C no es un plásmido conjugativo.

Es importante conocer los mecanismos de diseminación de los plásmidos que portan multirresistencia. Para esto, se evalúa la capacidad del plásmido de auto-transferirse a otras cepas de la misma o de diferente especie. Previamente, experimentos de conjugación en el laboratorio realizados con 17 cepas IncA/C, mostraron que solo la cepa YU39pA/C CMY+ puede transferir el pA/C CMY+ a *E. coli* DH5 α , pero a frecuencias muy bajas (10^{-7}) (Wiesner et al., 2009).

Para confirmar que el YU39pA/C es poco efectivo para auto-transferirse, se utilizó la cepa transformante D-pA/C como donadora en conjugación hacia *E. coli* DH5 α . Inesperadamente, no sólo es poco efectivo sino que ni siquiera se recuperaron transconjugantes en las tres repeticiones. Estos resultados nos indican que el plásmido pA/C no es capaz de auto-transferirse en su forma nativa desde un fondo *E. coli*.

11.4 La conjugación del YU39pA/C se debe a factores intrínsecos de la cepa donadora.

Cuando utilizamos la cepa YU39pA/C como donadora en conjugación y como receptoras cepas de *Salmonella* con el pSTV y cepas de *E. coli* con y sin el pSTV (Tabla 1), encontramos que, en general, sin importar la cepa receptora ó la presencia del pSTV, la frecuencia de conjugación obtenida fue muy baja (entre 10^{-6} y 10^{-7}) (Tabla 2), comparada con lo reportado en otros estudios para otros pA/C (Poole et al., 2009, Welch et al., 2007). El análisis de las transconjugantes mostró que en las receptoras SO1 y DH5 α , todas fueron positivas para el pA/C (genes *repA/C* y *bla*_{CMY-2}), mientras que en las receptoras LT2 y HB101, todas las transconjugantes fueron positivas para *bla*_{CMY-2}, pero sólo el 10 y 30%, fueron positivas para el gen *repA/C* (Tabla 2). Inesperadamente, en estas receptoras el restante de las transconjugantes (90 y 70% respectivamente) fueron positivas para el *oriX1*. Por esta razón fue necesario calcular una nueva frecuencia de conjugación con el número de cepas positivas para *repA/C* (entre 10^{-7} y 10^{-8}). En conclusión, de este experimento obtuvimos dos tipos de transconjugantes: por un lado las positivas para el pA/C y por otro lado las positivas para el pX1 con el *bla*_{CMY-2}. Estos resultados además se confirmaron por perfil de plásmidos, en donde para las pX1 positivas se observa una banda de 50 Kb aprox. Como el objetivo de este estudio es caracterizar la capacidad conjugativa del pA/C, se decidió trabajar únicamente con las transconjugantes positivas para A/C.

Tabla 2. Frecuencias de conjugación del YU39pA/C en diferentes receptoras.

Cepa receptora			Frecuencia de conjugación ^a de CMY-2 (n=4)	Tc ^b	Tc pA/C positivas ^c	Tc pX1 positivas ^d	Frecuencia de conjugación ^a de pA/C (n=4)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	SO1	pSTVspvC::Km	3.2 x 10 ⁻⁸	36	34	2	3 x 10 ⁻⁸
	LT2	pSTVspvC::Km	1.6 x 10 ⁻⁸	23	3	20	9.4 x 10 ⁻⁹
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	-	2.3 x 10 ⁻⁷	15	15	0	2.3 x 10 ⁻⁷
	HB101	-	1.6 x 10 ⁻⁶	28	9	19	5.12 x 10 ⁻⁷
	HB101	pSTVspvC::Km	8.3 x 10 ⁻⁸	28	8	20	2.3 x 10 ⁻⁸

^a Calculada como # transconjugantes / # donadoras. ^b Tc: transconjugantes analizadas en total para las 4 repeticiones. ^c Tc positivas para *repA/C*. ^d Tc positivas para *oriX1*. n=4: 4 repeticiones.

11.5 El pA/C transconjugante presenta diferentes tamaños en las receptoras.

Las transconjugantes analizadas por lisis alcalina y Eckhardt mostraron que:

1) los pA/C transconjugantes en SO1pSTVspvC::Km y *E. coli* DH5α tienen un mayor tamaño (160 Kb) en aproximadamente el 50% de las transconjugantes y, adicionalmente, notamos la presencia del pColE1-like (el de 5Kb) en el 90% de los casos. 2) Los pA/C transconjugantes en LT2 pSTVspvC::Km, HB101 con y sin pSTV, también tienen un plásmido de mayor tamaño que el esperado, mientras que la movilización del pColE1-like sólo se observó en el 13% de estas transconjugantes.

Se escogieron 11 pA/C transconjugantes que mostraron diferencias en su tamaño, para un análisis más detallado (Tabla 3). De éstas, 4 se obtuvieron en SO1, 2 en *E. coli* DH5α, 2 en HB101, 2 en HB101pSTVspvC::Km y 1 en LT2 (Figura 6: ejemplo de SO1). Todos los pA/C transconjugantes, así como el pSTV de algunas receptoras, se aislaron mediante electroporación a *E. coli* DH5α para analizar su perfil de digestión con *Pst*I y *Hind*III respectivamente (Figura 6). En general los pA/C de diferentes tamaños mostraron pérdida o ganancia de bandas con respecto al perfil del D-pA/C silvestre y fueron diferentes entre ellos, mientras que los pSTV fueron todos idénticos en su perfil de restricción (Figura 6).

Estos resultados muestran que el pSTV no se modificó en su esqueleto durante el proceso de conjugación, lo cual confirma la estabilidad descrita para este elemento (Chu & Chiu, 2006). En contraste, se observaron diferentes modificaciones en el esqueleto del pA/C. Estos resultados sugieren que las modificaciones de los pA/C suceden en la cepa donadora antes de la conjugación y que los fragmentos de ADN insertados provienen de otro elemento presente en la donadora, ya sea plasmídico o cromosomal. Estos fragmentos insertados parecen no involucrar el pSTV de las receptoras.

Para determinar si los fragmentos insertados en los pA/C transconjugantes involucraban el pColE1-like movilizado o el pSTV de la receptora, se hibridaron sus respectivos perfiles de plásmidos, utilizando como sonda marcada radioactivamente el pColE1-like o el pSTV completo. Como resultado no se detectó ninguna señal positiva, indistintamente de la sonda utilizada sobre los pA/C transconjugantes, confirmando que estos dos plásmidos no están involucrados en los nuevos fragmentos observados (datos no mostrados).

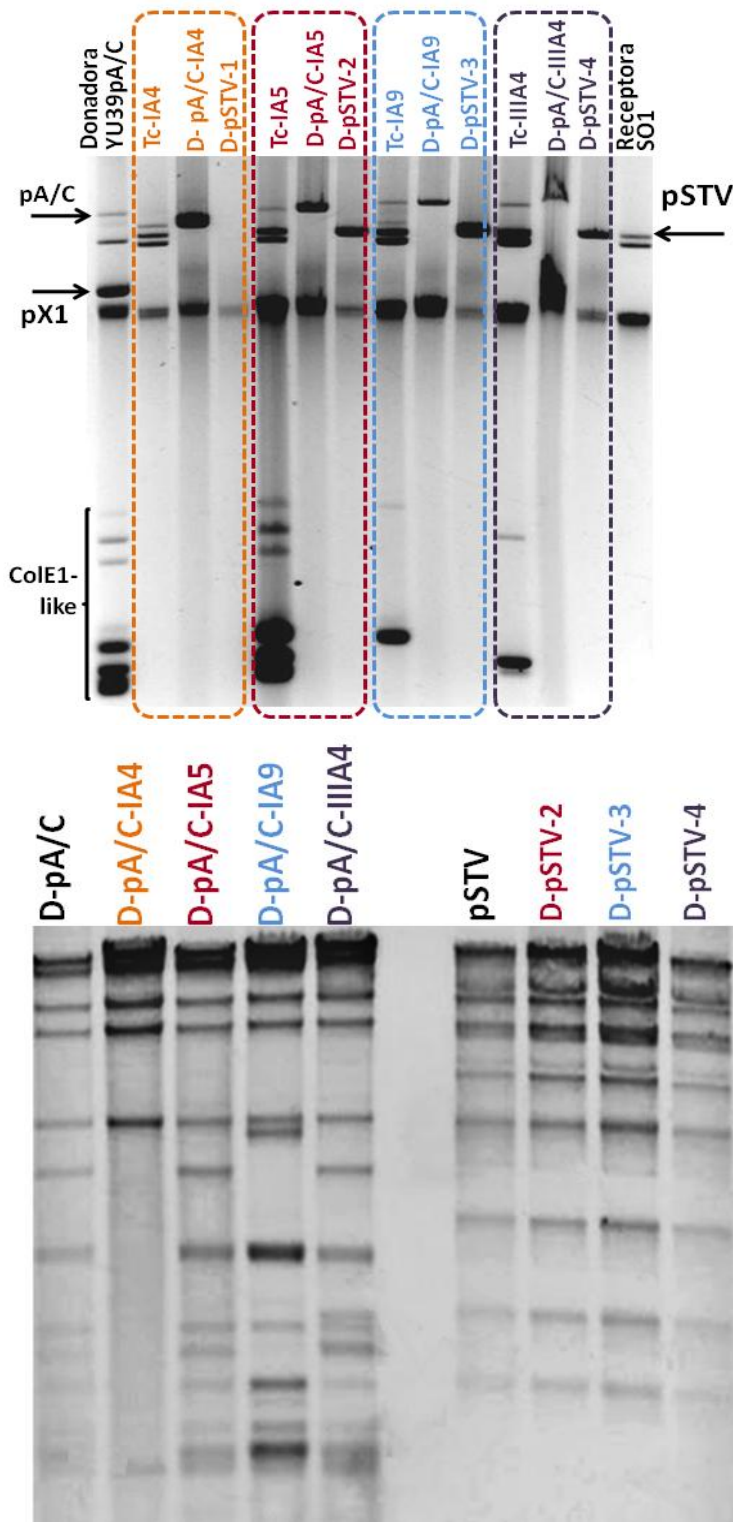


Figura 6. Ejemplo de pA/C transconjugantes de diferentes tamaños recuperados en la receptora SO1pSTVspvC::Km. Imagen superior. Perfil de plásmidos de 4 transconjugantes con pA/C modificados. Donadora YU39pA/C con todos sus plásmidos mencionados en Materiales y Métodos. La cepa receptora es la SO1pSTVspvC::Km. Para cada uno de los recuadros se muestra en el primer carril el perfil plasmídico de la transconjugante con el pA/C, el pSTV y el pColE1; en el segundo carril el pA/C separado por transformación en *E. coli* DH5 α , y en el tercer carril el pSTV separado por transformación en *E. coli* DH5 α . La imagen inferior muestra los perfiles *Pst*I de los pA/C modificados. El primer carril corresponde al D-pA/C de referencia y en los siguientes cuatro carriles se pueden observar los perfiles de los pA/C transconjugantes. Después del carril en blanco se presenta el perfil generado con *Hind*III del pSTV de la SO1 y en los siguientes tres carriles los pSTV recuperados en las receptoras, después de la conjugación, para los cuales no se observa variación.

11.6 Los pA/C transconjugantes de mayor tamaño pueden estar co-integrados con el pX1 (de 35kb) presente en la donadora.

Después de descartar alguna interacción del pA/C con el pSTV o el pColE1-like, se realizaron tres hibridaciones sobre los perfiles de plásmidos de las cepas YU39pA/C (donadora), SO1pSTVspvC::Km (receptora) y de la transconjugante D-pA/C para conocer el origen de los fragmentos insertados en los D-pA/C de 160 Kb.

Primero utilizamos como sonda el D-pA/C marcado radioactivamente para descartar homología entre el pA/C y los otros plásmidos presentes en la donadora y el pSTVspvC::Km. La hibridación mostró que el pA/C no tiene homología con ninguno de los plásmidos. Posteriormente, hibridamos con el D-pA/C-IA9 que tiene un tamaño de 160 Kb. Como resultado observamos que la señal dio positiva únicamente con el pA/C de la donadora, lo que nos indica que el aumento de tamaño en este plásmido se debe a re-arreglos (duplicaciones) en el esqueleto del pA/C. Por último, utilizamos como sonda el D-pA/C-III A4 de 160 Kb. Esta hibridación mostró dos señales muy intensas sobre la cepa donadora: una con el plásmido pA/C y la otra con el pX1. Estos resultados nos indican que el D-pA/C-III A4 contiene fragmentos del pA/C y del pX1, o bien que es un co-integrado.

Para confirmar cuantos de los pA/C transconjugantes que se escogieron estaban co-integrados con el pX1, se hibridaron los patrones de restricción *Bam*HI y *Nco*I de los D-pA/C transconjugantes junto con el D-pX1 y el D-pA/C, usando como sonda el D-pX1 marcado radioactivamente (Figura 7 y Anexo1). Como resultado observamos que de los 11 pA/C transconjugantes, 8 fueron positivos para la presencia del pX1, la mayoría de los casos en los recuperados en *E. coli* (Tabla 3). Estos resultados nos indican que en el 70% de los casos analizados, el aumento de tamaño en los pA/C transconjugantes se debe a una co-integración con el pX1. Sin embargo, cabe resaltar que existen re-arreglos en los pA/C transconjugantes que no involucran segmentos del pX1, los cuales se observaron en la receptora SO1 ST 19. Por consiguiente, se evaluó la presencia del pX1 mediante tamizaje por PCR en las 36 transconjugantes pA/C recuperadas en SO1 ST 19 (Tabla 2). Inesperadamente, 35 de los 36 pA/C transconjugantes fueron negativos para el pX1, lo que indica que en esta receptora es predominante la presencia de pA/C re-arreglados pero no co-integrados.

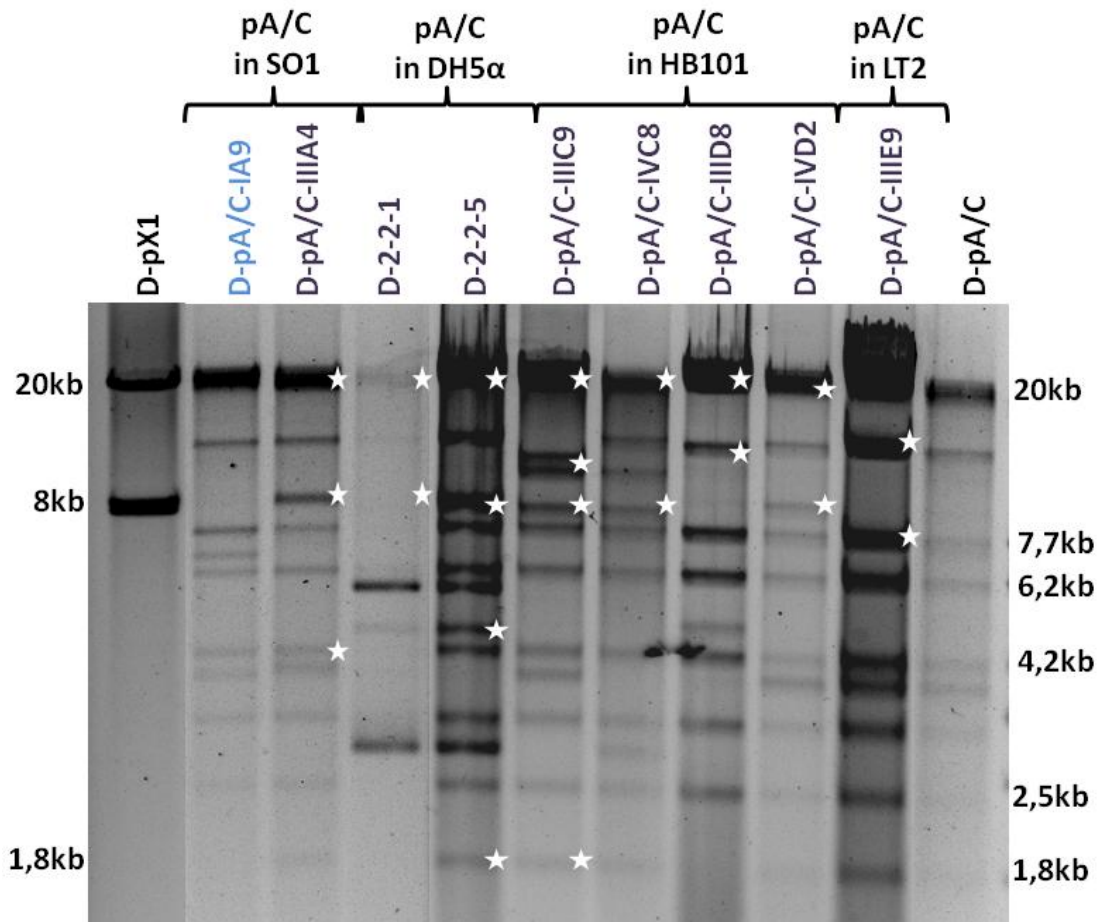


Figura 7. Perfil de restricción de los D-pA/C-(transconjugantes) generado con *Bam*HI y *Nco*I. El D-pX1 genera dos bandas de 8 y 20 Kb mientras que del D-pA/C genera nueve bandas (1,8 Kb a 20 Kb) con la doble digestión, compartiendo la banda de 20 Kb. En los D-pA/C-(transconjugantes) positivos para pX1 (Tabla 3), es posible identificar la banda de 8 Kb correspondiente al pX1 la cual hibridó positivamente al utilizar como sonda el D-pX1 marcado radioactivamente al igual que la banda de 20 Kb (estrellas blancas y Anexo 1). Adicionalmente, se identificaron bandas de otros tamaños positivas en la hibridación. Este resultado, sumado a los diferentes patrones de restricción observados en los plásmidos, indica que además de la co-integración existen diferentes re-arreglos entre los dos plásmidos (i.e duplicaciones).

11.7 Caracterización del pX1

Basados en las secuencias de estos plásmidos y en la información conocida acerca de la conjugación del R6K (Nuñez et al., 1997), se escogieron cinco genes para realizar el tamizaje por PCR en los pA/C co-integrados: *oriX1* importante para la replicación, *taxB*, *taxC* y *ddp3* importantes en la conjugación y *ydgA* que codifica para una Topoisomerasa tipo III (Figura 8, Tabla S1).

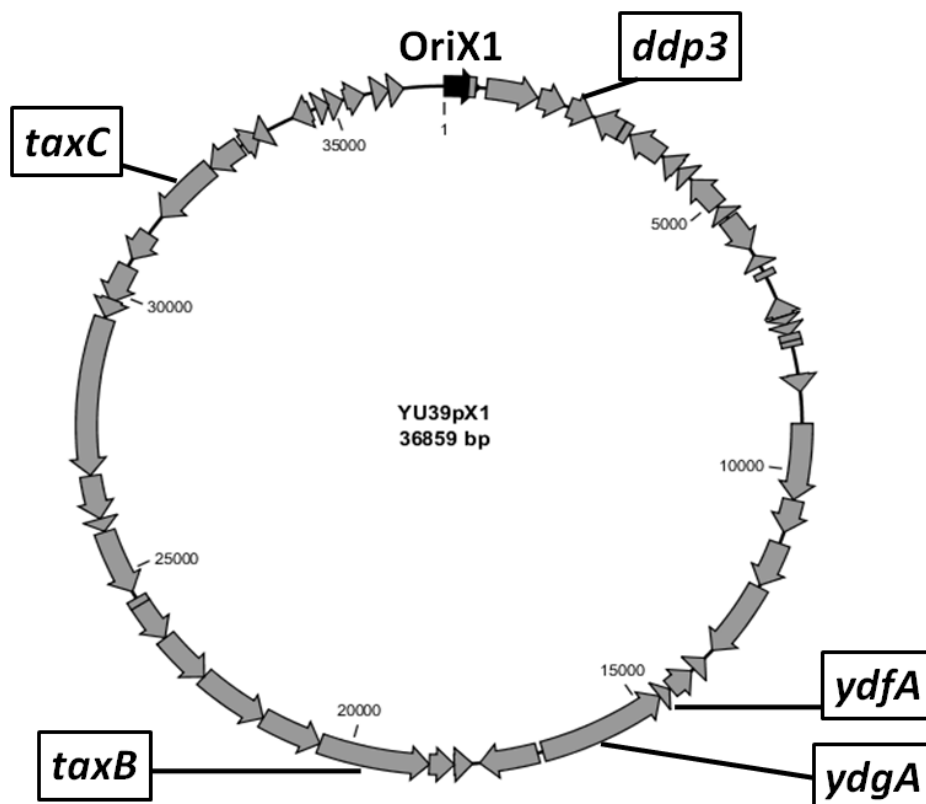


Figura 8. Plásmido YU39pX1. El esquema representa una versión preliminar de la secuencia del pX1 presente en la cepa YU39. En la posición 1, en negro se muestra el *oriX1*. Las líneas negras señalan la posición de los genes *ddp3*, *taxC*, *taxB* y *ydgA* que se utilizaron en el tamizaje del pX1 en las transconjugantes. Adicionalmente, se muestra el gen *ydfA* que se reemplazó por un casete de kanamicina, como se describió en materiales y métodos. La secuencia parcial del YU39pX1 fue realizada por Rob Edwards (San Diego State University, comunicación personal).

Como era lo esperado, la cepa donadora YU39pA/C amplificó todos los marcadores. Los pA/C que fueron positivos por hibridación para el pX1 amplificaron los 5 genes evaluados, a excepción de la D-pA/C-IIID8 que sólo amplificó el *oriX1* y el *ydgA*. Por otro lado, la cepa D-pA/C-IIIIE9 fue positiva en la hibridación con el pX1 pero negativa a los 5 marcadores evaluados, lo que indica que este plásmido podría contener otros fragmentos del pX1 que no podemos detectar bajo nuestro esquema (Tabla 3).

Teniendo en cuenta que la población de *Typhimurium* ST 213 muestra una gran cantidad de plásmidos (Wiesner et al., 2011), realizamos un tamizaje con los genes mencionados anteriormente para detectar la presencia del pX1 en las 68 cepas previamente caracterizadas (Wiesner et al., 2011). Ninguno de los aislamientos amplificó los fragmentos correspondientes al pX1, excepto la YU39, lo que nos indica que este plásmido no es predominante en nuestra población.

Adicionalmente, es importante conocer la frecuencia de conjugación del pX1 presente en la cepa YU39pA/C; sin embargo, este plásmido no posee genes de resistencia para su selección. Por esta razón marcamos el pX1 con un casete de resistencia a KM por dos metodologías. Por mutagénesis con el EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp, el cual se insertó a 398 pb corriente arriba del codón de término del gen *ydgA* (Figura 9); en una cepa que se denominó D-pX1*ydgA*::*Tn5*. La otra fue mediante el reemplazo del gen *ydfA* por la técnica de Wanner (Datsenko & Wanner, 2000), en la cepa que se denominó D-pX1*ydfA*::*Km*. De acuerdo a las secuencias de varios plásmidos pX1, estos dos genes (*ydgA* y *ydfA*), parecen hacer parte de un operón de tres genes que se ha denominado “región de modulación de la expresión génica (*gem*)” (Figura 9) (Chu et al., 2008, Norman et al., 2008). El primero de ellos, el gen *ydgA* codifica para una Topoisomerasa tipo III, posiblemente involucrada en la adecuada resolución de los dímeros de ADN plasmídicos formados en el momento de la replicación (Li et al., 1997). El segundo de ellos, el gen *ydfA* codifica para la proteína HhA la cual modula la síntesis de hemolisina y disminuye el súper enrollamiento negativo de los plásmidos (Carmona et al., 1993). El tercer gen, codifica para una proteína putativa de unión a ADN la cual es homóloga a la proteína H-NS del cromosoma de *E. coli*. Sin embargo, aunque Norman y colaboradores (Norman et al., 2008) sugieren que este módulo *gem* en el pX1 podría estabilizar la transferencia horizontal de este plásmido, es de notarse que las mutantes generadas se replican y se conjugan eficientemente.

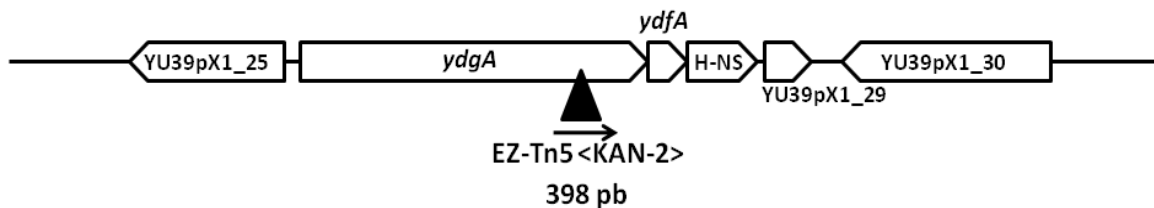


Figura 9. Sitio de inserción del EZ-Tn5 <KAN-2> en el D-pX1. En esta gráfica se utiliza como referencia la secuencia preliminar del plásmido YU39pX1 (Rob Edwards; San Diego State University, comunicación personal) para representar la inserción del transposón EZ-Tn5 <KAN-2>, 398 pb corriente arriba del codón de término del gen *ydgA*, generando la cepa D-pX1*ydgA*::*Tn5*.

Los dos plásmidos pX1 marcados con KM tuvieron frecuencias de conjugación de 10^{-1} cuando fueron conjugados a la receptora *E. coli* DH5 α , las cuales son mayores a las reportadas para este grupo (10^{-2} a 10^{-3}) (Nuñez et al., 1997). Simultáneamente, se realizó una mutante en el gen *taxB* que codifica para la T4CP, la cual es indispensable para la exitosa conjugación del pX1

(Nuñez et al., 1997). Esta mutante denominada D-pX1*taxB::Km* no conjugó de acuerdo a lo esperado, confirmando la importancia de este gen en la transferencia horizontal.

11.8 Los pA/C co-integrados aumentan su frecuencia de conjugación hasta en cinco órdenes de magnitud.

Los pA/C transconjugantes se electroporaron a DH5 α y estas cepas se utilizaron como donadoras en una segunda ronda de conjugación (Tablas 1 y 3). Como resultado encontramos que todas las cepas que fueron positivas para el pX1, excepto la D-pA/C-III E9, aumentaron su frecuencia de conjugación hasta en cinco órdenes de magnitud (10^{-1} a 10^{-2}) y en el caso de la cepa D-pA/C-IIID8 en tres órdenes de magnitud (10^{-5}) (Tabla 3). Estos resultados nos sugieren que en estos pA/C transconjugantes el origen de transferencia funcional es el del pX1, ya que la frecuencia de conjugación obtenida corresponde a la reportada para este grupo IncX (Hansen et al., 2011, Nuñez et al., 1997). Además, cabe resaltar que la sola presencia del *oriX1* permite la conjugación del pA/C co-integrado aunque a menores frecuencias (cepa D-pA/C-IIID8), lo que concuerda con lo reportado en otros estudios (Grudniak et al., 2007).

11.9 El pX1 es el responsable de la conjugación del pA/C.

Con los resultados anteriores demostramos que el D-pA/C es una cepa negativa para conjugación, contrario a la donadora YU39pA/C, la cual es capaz de transferir el pA/C co-integrado con el pX1 en la mayoría de los casos. Estos resultados nos sugieren que la presencia de un plásmido altamente conjugativo como el pX1, favorece la conjugación exitosa del pA/C. Se ha reportado que este grupo IncX tiene la capacidad de movilizar plásmidos de otros grupos, como IncQ y los de la familia ColE1 (Cabezón et al., 1994). También se ha reportado la co-integración del pX1 con pSVs en diferentes serovares de *Salmonella*, como por ejemplo lo observado en el serovar Dublin, que porta una variante de pSDV de mayor tamaño, el cual está co-integrado con un pX1 (Chu et al., 2008); y en el serovar Typhimurium, se ha reportado un pSTV de mayor tamaño que resulta de la co-integración con un plásmido del tipo IncX, el cual conserva sus propiedades de virulencia (Platt et al., 1988). De manera similar, se ha reportado la co-integración entre dos pX1 (R485-pOLA52-*bla::npt*) (Norman et al., 2008), lo que indica que este plásmido posee sitios blancos de recombinación.

Para confirmar que el pX1 media la conjugación del pA/C, la cepa D-pA/C se electroporó con los pX1 mutantes, generando las cepas D-pA/CpX1ydgA::Tn5, la cepa D-pA/CpX1ydfA::Km y la cepa D-pA/C pX1*taxB::Km*. Estas se utilizaron como donadoras en conjugación hacia la *E. coli* DH5 α . El resultado obtenido confirmó que el pA/C sólo puede conjugarse en la presencia del pX1 funcional, al no recuperar transconjugantes cuando se utilizó el D-pX1*taxB::Km* deficiente en conjugación. La cepa D-pA/C adquirió la capacidad conjugativa en presencia de los dos pX1 conjugativos mencionados anteriormente. Las transconjugantes se seleccionaron con tres diferentes antibióticos, KM, CRO y KM-CRO para los cuales variaron los resultados (Tabla 4). Al seleccionar con KM, la frecuencia de conjugación promedio para las dos donadoras fue de 10^{-1} y, congruentemente con los resultados anteriores, las colonias recuperadas sólo fueron positivas para el pX1, pero adicionalmente fueron resistentes a CRO. Al seleccionar con CRO, las frecuencias

de conjugación promedio para las dos donadoras fueron de 10^{-5} y en las 12 colonias evaluadas, 8 fueron positivas tanto para pA/C como para pX1, mientras sólo 4 fueron positivas para pX1 (también resistentes a CRO). Al seleccionar con KM-CRO, la frecuencia de conjugación promedio fue de 10^{-7} y, de 18 colonias evaluadas, 17 fueron positivas para los dos plásmidos y sólo una para el pX1 (también resistente a CRO). En las colonias positivas para los dos plásmidos, se confirmó la co-integración de estos mediante Eckhardt y lisis alcalina (Figura 10); y en las colonias positivas solamente para el pX1, se observó únicamente la banda correspondiente a este plásmido. Inesperadamente, en este experimento recuperamos el mismo tipo de plásmidos encontrados en las conjugaciones iniciales de la YU39pA/C a *E. coli* (DH5 α y HB101) y LT2 (Tabla 2 y 4): por un lado cepas con co-integrados entre el pA/C y el pX1 y por otro lado cepas con el pX1 que portan el gen *bla*_{CMY-2}, pero no observamos transconjugantes con el pA/C sin co-integración con el pX1, como ocurrió para la receptora SO1, posiblemente porque este resultado es dependiente de la receptora utilizada ó porque es necesario la presencia de otros elementos presentes en la donadora YU39 que aún desconocemos.

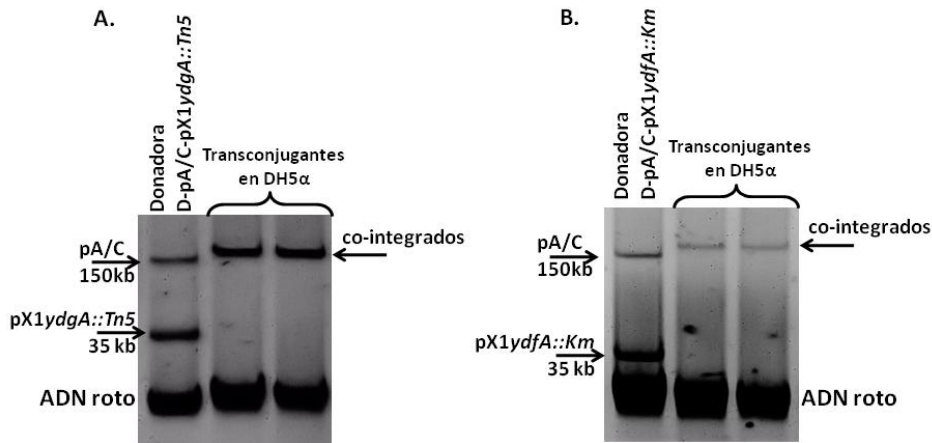


Figura 10. El pA/C es movilizado por co-integración con el pX1. Se probaron los plásmidos pX1 mutantes capaces de conjugarse en la cepa D-pA/C negativa para conjugación. Como resultado observamos una banda de mayor tamaño en las transconjugantes seleccionadas con KM-CRO, que corresponde al co-integrado entre D-pA/C y pX1 al utilizar como donadora: A. la cepa D-pA/CpX1ydgA::Tn5; B. la cepa D-pA/CpX1ydfA::Km.

11.10 Caracterización del pColE1-like.

Cuando empezamos el análisis de las transconjugantes pA/C obtenidas en SO1pSTVspvC::Km y *E. coli* DH5 α , en el 90% de los casos observamos la co-transferencia de un plásmido pequeño de aproximadamente 5 Kb, al igual que en el 13% de los pA/C transconjugantes recuperados en LT2 pSTVspvC::Km, HB101 con y sin pSTV.

Debido a su co-transferencia inesperada con el pA/C, decidimos caracterizarlo mediante secuenciación para poder asignarle un grupo de replicación y conocer si portaba algún gen de resistencia.

Como resultado encontramos que nuestro plásmido tiene un tamaño de 4596 pb, que tiene un porcentaje de similitud del 85% con el plásmido SN11/00Kan recuperado en el serovar Newport (Chen et al., 2010) y que pertenece a la familia de plásmidos ColE1-like. Basados en este plásmido detectamos y anotamos las siguientes regiones: los genes de la relaxasa *mobA* y el operón *mobCABD*; las regiones de ADN y ARN involucradas en el proceso de replicación/terminación como ROM, RNA I, RNA II, *oriV*, *oriT* y *cer*. Adicionalmente en nuestra secuencia, detectamos la presencia de dos ORFs que no se encuentran presentes en el pSN11/00Kan, ni en ningún plásmido de tipo ColE1 secuenciado. El primer ORF denominado “hypotetical protein 1” de 357 pb, para el cual no encontramos ningún homólogo al realizar la búsqueda tanto en el blastn como en el blastp, y el segundo ORF denominado “hypotetical protein 2” de 756 pb, codificado en la hebra complementaria y el cual tuvo un 100% de identidad por blastp, con una proteína hipotética del cromosoma de *E. coli* TA007 identificada como ERHG_05035 (Accession Number EGB64195.1). Contrario a lo reportado por otros grupos, no encontramos genes de resistencia a antibióticos en el pColE1-like (Chen et al., 2010). En resumen, la caracterización del pColE1-like permitió identificar siete genes y todas las regiones indispensables para su replicación/terminación (Figura 11).

Anteriormente, nosotros describimos que las cepas ST 213 portan un gran número de plásmidos de diferentes tamaños (desde 3 a 160 Kb) (Wiesner et al., 2011). Para determinar la prevalencia del pColE1-like en este genotipo y si la “proteína hipotética 2” era predominante en la población, se amplificó por PCR esta región con los oligos orfX5'-I y orfX3'-I (Tabla S1) en los 68 aislamientos ST 213 pA/C, caracterizados previamente. Como resultado, la “proteína hipotética 2” se encontró en el 47% (32/68) de estos aislamientos. Simultáneamente, realizamos hibridación con el gen *mobB* marcado radioactivamente sobre los perfiles de plásmidos de 15 aislamientos. Todos excepto uno, generaron una señal positiva únicamente en las bandas correspondientes de 5-6 Kb, confirmando que estas corresponden al pColE1-like y sus isoformas. Estos resultados nos muestran que este pColE1-like está conservado y es predominante en nuestra población ST213 y que se encuentra asociado al pA/C.

Tabla 3. Transconjugantes pA/C analizadas.

Receptora	Frec ^a	Colonia Tc	Tamaño del plásmido kb ^b	Genes utilizados para el tamizaje del pX1						2 nd de conjugación (Rep) ^d	
				Ori X1	<i>ydgA</i>	<i>taxC</i>	<i>taxB</i>	<i>ddp3</i>	Hib. con pX1 ^c	Estricta ^e	DH5α ^f
SO1	10 ⁻⁸	IA4	130	No	No	No	No	No	Neg	NC (0/4)	NC (0/3)
		IA5	150	No	No	No	No	No	Neg	NC (0/4)	NC (0/3)
		IA9	160	No	No	No	No	No	Neg	NC (0/4)	NC (0/3)
		IIIA4	160	Si	Si	Si	Si	Si	4;8;20kb	10 ⁻⁸ (2/4)	10 ⁻² (0/3)
DH5α	10 ⁻⁷	221-1	160	Si	Si	Si	Si	Si	8;20kb	10 ⁻² (2/2)	/ ^g
		221-10	160	Si	Si	Si	Si	Si	8;20kb	1 (2/2)	/
		225-1	160	Si	Si	Si	Si	Si	1,8;5;8;20kb	1 (2/2)	/
		225-7	160	Si	Si	Si	Si	Si	1,8;5;8;20kb	10 ⁻¹ (2/2)	/
HB101	10 ⁻⁶	IIIC9	160	Si	Si	Si	Si	Si	1,8;8;12;20kb	10 ⁻² (2/2)	10 ⁻¹ (2/2)
		IVC8	160	Si	Si	Si	Si	Si	8;20kb	10 ⁻¹ (2/2)	10 ⁻² (2/2)
HB101 (pSTV)	10 ⁻⁸	IIID8	160	Si	Si	No	No	No	15;20kb	10 ⁻⁵ (3/4)	10 ⁻⁵ (1/4)
		IVD2	160	Si	Si	Si	Si	Si	8;20kb	10 ⁻² (1/2)	NC (2/2)
LT2	10 ⁻⁸	IIIE9	160	No	No	No	No	No	7,7;15kb	NC (3/2)	NC (2/2)

^a Frecuencia de conjugación obtenida en la primera ronda expresada como # transconjugantes / # donadoras. ^b Tamaño del pA/C transconjugante visualizado por lisis alcalina y Eckhardt y comparado con el pA/C wt. ^c Tamaño en Kb de las bandas que hibridaron positivamente con el pX1 marcado radioactivamente sobre la digestión con *Bam*HI y *Nco*I. Neg: negativo. ^d Frecuencia de conjugación obtenida en la segunda ronda de conjugación expresada como # transconjugantes / # donadoras. El número entre paréntesis corresponde al número de conjugaciones positivas sobre número de repeticiones. ^e Resultado de la segunda ronda de conjugación a la receptora en donde se recuperó originalmente. Ej. D-pA/C-IA4 a SO1. ^f Resultado de la segunda ronda de conjugación a DH5α. Ej. D-pA/C-IA4 a DH5α. ^g En estas cepas la receptora estricta era DH5α.

Tabla 4. Resultado de las conjugaciones del pA/C y el pX1 juntos en una cepa *E. coli* DH5 α como donadora.

Donadora (plásmidos en DH5 α)	Receptora DH5 α RifNal (selección) ^a	Frecuencia de conjugación Tc/D ^d	Colonias evaluadas	Colonias positivas para pA/C ^b y pX1 ^c	Colonias positivas para pA/C únicamente	Colonias positivas para pX1 únicamente
D-pA/C pX1ydgA::Tn5	KM	10 ⁻¹	4	0	0	4
	CRO	10 ⁻⁷	6	6	0	0
	KM-CRO	10 ⁻⁷	12	12	0	0
D-pA/C pX1ydfA::Km	KM	10 ⁻¹	8	0	0	8
	CRO	10 ⁻⁵	6	2	0	4
	KM-CRO	10 ⁻⁸	6	5	0	1
D-pA/C pX1taxB::Km	KM	0	0	0	0	0
	CRO	0	0	0	0	0
	KM-CRO	0	0	0	0	0

^a Km: kanamicina; selección para el pX1. Cro: ceftriaxona; selección para el pA/C. KMCRO: kanamicina, ceftriaxona; selección para co-integrados entre el pA/C y el pX1 o pX1 con la isla CMY-2. ^b Marcadores descritos previamente en (Wiesner et al., 2011). ^c Marcadores descritos en este estudio. ^d los datos son el promedio de 2 repeticiones.

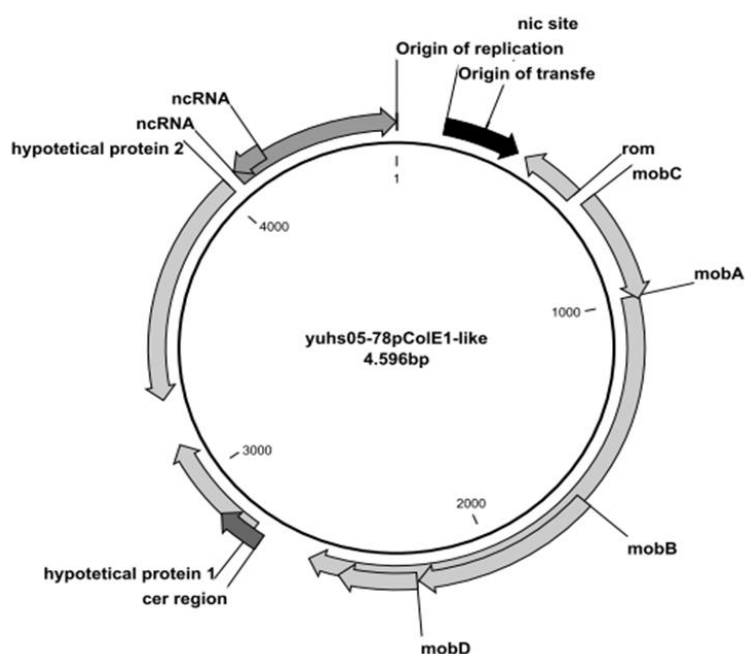


Figura 11. Caracterización del YU39pColE1-like. En la imagen se puede observar la ubicación de todas las regiones identificadas en este plásmido y su dirección de transcripción. Las flechas en gris claro corresponden a los ORFs detectados. Las flechas en gris oscuro corresponden a los ARN no codificantes involucrados en la replicación. Las flechas en negro corresponden al origen de transferencia (*oriT*) y la región de resolución de dímeros (*cer* región). Dentro del *oriT* se identificó el sitio *nick*. La posición 1 corresponde al origen de replicación. Se observan las dos proteínas hipotéticas mencionadas en el texto.

12 Discusión

12.1 El pSTV y el pA/C son compatibles.

Los grupos de incompatibilidad en los plásmidos están determinados por el origen de replicación. Incompatibilidad se define como la incapacidad de dos plásmidos de mantenerse de forma independiente en una misma cepa. Esto sucede porque dos plásmidos tienen el mismo origen de replicación o el mismo sistema de segregación, por lo que compiten por las mismas proteínas y los mismos sitios de unión en la célula huésped, hasta que uno de los dos termina perdiéndose (Couturier et al., 1988).

En trabajos anteriores, nosotros encontramos en aislamientos mexicanos de *Typhimurium*, una asociación entre el genotipo ancestral ST 19 con el pSTV y entre el emergente ST 213 con el pA/C. Por otro lado, no observamos ninguna cepa de *Typhimurium* con los dos plásmidos presentes (Wiesner et al., 2009). Para tratar de dilucidar una posible incompatibilidad entre los dos plásmidos, realizamos una serie de experimentos incluyendo electroporaciones y conjugaciones a cepas de *Typhimurium* y a cepas de *E. coli* de laboratorio. Para esto probamos 1) si el pSTV y el pA/C eran compatibles, 2) si el pSTV y el pA/C eran conjugativos y 3) si podían ser adquiridos por los dos genotipos de *Typhimurium*. En este trabajo encontramos, que estos dos plásmidos son compatibles y estables hasta 80 generaciones, cuando se encuentran juntos ya sea en *E. coli* ó en los dos genotipos de *Typhimurium* descritos en nuestra población, lo que podría indicar que no existe una restricción que impida el encontrar una cepa ST 19 o 213 con ambos plásmidos (Figura 5). Sin embargo, algunos de nuestros resultados sugieren que las limitantes podrían encontrarse al momento de adquirir los plásmidos. No obstante, los resultados obtenidos por conjugación muestran que estas cepas si tienen la capacidad de recibir pA/Cs de mayor tamaño (160 Kb) (Tabla 3). Por otro lado, aunque el pSTV se electroporó exitosamente a la cepa YU39 ST213, no fue igual de exitoso por conjugación. Una hipótesis podría ser, que existe cierta incompatibilidad con el plásmido YU39p100 (ver Materiales y Métodos), el cual aún no caracterizamos y que estas barreras son eliminadas en el momento de la electroporación al desplazar el plásmido residente por el plásmido entrante, fenómeno que no analizamos en detalle. Otra hipótesis es la posibilidad de que en la célula receptora, se codifiquen barreras de entrada tales como la exclusión de superficie o la exclusión de entrada que no permitan la conjugación del plásmido pSTV. Actualmente, contamos con la secuencia preliminar de la cepa YU39, lo que nos permitirá buscar mediante herramientas bio-informáticas si existe alguna secuencia homóloga a los genes *traT* y *traS* que pudieran ser responsables de este fenómeno.

Estas situaciones anteriormente mencionadas, podrían ser limitantes en la adquisición de los dos plásmidos por una misma cepa en el ambiente y podría ser una explicación al fenómeno observado en nuestra población.

12.2 El pA/C CMY+ presente en la población Mexicana de *Typhimurium*, no es conjugativo.

En la última década, los plásmidos del grupo IncA/C se han estudiado ampliamente principalmente por su capacidad de conferir multirresistencia a antibióticos y porque se encuentran en una gran variedad de enteropatógenos. Todos los IncA/C secuenciados muestran dos regiones que codifican los genes involucrados en la conjugación denominadas Tra1 y Tra2

(Fernandez-Alarcon et al., 2011). Sin embargo, las frecuencias de conjugación reportadas para estos plásmidos son muy variables. Varios autores han planteado que la inserción de la región CMY-2 en Tra1, en medio de los genes *traC* y *traA* afecta la capacidad de conjugación de estos plásmidos, pero este fenómeno no ha sido analizado con detalle hasta la fecha. Welch y colaboradores (Welch et al., 2007) reportaron frecuencias de conjugación para el pA/C de entre 10^{-3} hasta 10^{-7} en algunas cepas de Typhimurium, mientras que todos los pA/C presentes en cepas del serovar Newport son incapaces de conjugarse. Poole y colaboradores (Poole et al., 2009) reportaron frecuencias de conjugación para el pA/C CMY+ de entre 10^{-2} y 10^{-7} y observaron que en los casos donde el pA/C se encontraba con otro plásmido de diferente grupo Inc, se co-transferían los dos replicones en la conjugación; estos resultados fueron confirmados por PCR-replicon typing pero no mediante perfil de plásmidos. Por otro lado, observaron que los pA/C CMY- tienen mayores frecuencias de conjugación con respecto a los pA/C CMY+. Otros autores reportaron frecuencias de conjugación para el pA/C CMY+ de entre 10^{-2} a 10^{-3} (Call et al., 2010, Fricke et al., 2009). Nosotros encontramos que de 17 pA/C evaluados con o sin CMY-2, solo una cepa, la YU39 que es pA/C CMY+, fue positiva para la conjugación del pA/C, aunque con frecuencias por debajo de lo reportado por otros autores (10^{-7}) (Wiesner et al., 2011). Sin embargo, al separar el pA/C en una cepa *E. coli* DH5 α para confirmar su capacidad conjugativa, se demostró que el D-pA/C CMY+ por sí solo no es conjugativo.

En conjunto, estos resultados nos confirman que el pA/C presente en nuestra población ST 213, no es un plásmido conjugativo. Esta característica dificulta el panorama de adquisición de este plásmido por parte de una célula y podría ser otra posible respuesta al porque no encontramos cepas ST 19 con pA/C.

12.3 El pX1 como herramienta de transferencia de otros plásmidos.

El pX1 presente en la cepa YU39pA/C no posee genes de resistencia a antibióticos. Para determinar su frecuencia de conjugación insertamos un gen de resistencia a KM, y como resultados observamos que este pX1 tienen una frecuencia de conjugación de 10^{-1} , la cual está un orden de magnitud por encima de las reportadas (10^{-2} a 10^{-3}) (Hansen et al., 2011, Nuñez et al., 1997). La presencia del pX1 en la cepa YU39 conllevó a la conjugación exitosa del pA/C mediante la co-integración, lo que dio como resultado plásmidos de mayor tamaño con una mayor eficiencia de conjugación (Tabla 3). Nosotros demostramos que en un fondo de *E. coli* DH5 α , un pX1 deficiente en conjugación no es capaz de co-transferir el pA/C, mientras que con los pX1 conjugativos logramos repetir los resultados obtenidos en la conjugación de la cepa YU39 (Tablas 2, Tabla 4). En general, estos resultados nos confirman que el pA/C no es conjugativo y que la presencia del pX1 es importante para su diseminación.

La mutante deficiente en conjugación del pX1, esta truncada en la proteína acopladora (T4CP) que es la encargada de conectar el *relaxosoma* con el *transferosoma* para llevar a cabo la conjugación (Figura 3). Los resultados obtenidos sugieren que la T4CP del pA/C no es funcional y que la complementación con la T4CP del pX1, resulta en una conjugación exitosa de ambos plásmidos. Desconocemos si la relaxasa de nuestro pA/C es funcional. Consideramos que experimentos adicionales acerca de la interacción entre las relaxasas de los plásmidos pX1 y pA/C

y la T4CP del pX1 son necesarios para entender el mecanismo específico por el cual se lleva a cabo la movilización.

Los resultados obtenidos además reflejan una compleja interacción entre el pA/C y el pX1 que deriva en la co-integración de estos plásmidos o en la adquisición del gen *bla*_{CMY-2} por parte del pX1. Es importante aclarar que las frecuencias de conjugación reportadas para la YU39pA/C, realmente reflejan la frecuencia en que suceden ambos eventos (Tabla 2), las cuales se encuentran en el umbral de lo detectable. Este panorama plantea posibilidades casi nulas de transmisión en una población y es otra posible respuesta al porqué no encontramos el pA/C en una cepa ST 19.

El hecho de que el pA/C necesite de plásmidos altamente conjugativos para su diseminación, plantea una limitante en su mecanismo de dispersión. Este panorama se refleja muy bien en nuestra población ST 213: en las 17 cepas que evaluamos para conjugación, la única con la capacidad de transferir el pA/C fue la YU39 y es la única que porta también al plásmido pX1. Sin embargo, este resultado es de alto impacto en términos epidemiológicos, ya que por un lado estamos obteniendo pA/Cs multirresistentes capaces de diseminarse rápidamente, así como pX1s resistentes a CRO que también se diseminarían exitosamente en diferentes enteropatógenos, convirtiéndose ambos en un problema de salud pública más grave de lo que actualmente es.

Adicionalmente, se ha reportado que el pColE1-like puede mobilizarse tanto por los pX2 como por los pA/C, pero no existen reportes actuales que muestren una interacción con el pX1 (Selvaratnam & Gealt, 1993). En este estudio observamos que la presencia del pColE1-like se asocia al pA/C presente en las cepas ST 213, así como en los pA/C transconjugantes co-integrados o re-arreglados, pero no con el pX1. La asociación entre pA/C y plásmidos pColE1 ya se ha reportado para el serovar Newport (Chen et al., 2010). Sin embargo, en este estudio no profundizamos los mecanismos detallados de interacción entre estos dos plásmidos.

12.4 El pA/C como un elemento de alta plasticidad genética.

Un resultado interesante es el hecho de encontrar pA/C transconjugantes re-arreglados sin pX1, únicamente en la receptora *Typhimurium* SO1pSTVspvC::Km (Tabla 3). Si el pX1 moviliza el pA/C mediante co-integración, entonces ¿cómo llegaron estos plásmidos a la SO1 sin el pX1? Los plásmidos del grupo IncX1 tienen la capacidad de movilizar plásmidos IncQ y ColE1, los cuales codifican para su propia relaxasa y tienen su propio sitio de corte en el *oriT*. Se ha demostrado que mutantes del pX1 en los genes involucrados en la formación del relaxosoma, pero no en la formación del poro, pierden su capacidad conjugativa pero no la capacidad de movilizar otros plásmidos (Cabezon et al., 1994, Nuñez et al., 1997). Si esta fuera una posible explicación encontraríamos varios pA/C sin pX1 en las diferentes receptoras, lo cual no sucedió. Otra posible hipótesis es que la cepa SO1 ejerce barreras de entrada que desconocemos para el pX1, pero que permite la formación del poro conjugativo, el cual sería utilizado por el pA/C para transferirse. Sin embargo, los re-arreglos producidos en los pA/C transconjugantes podrían reflejar el porqué de la gran diversidad de re-arreglos descritos previamente en los pA/C asociados al ST 213, y que confirma que las inserciones y deleciones de fragmentos de ADN juegan un papel más importante en la evolución de estos plásmidos que la que ocurre por mutaciones puntuales en su esqueleto

(Fricke et al., 2009, Welch et al., 2007, Wiesner et al., 2009). Experimentos de conjugación del pX1 hacia la SO1 serían necesarios para tratar de entender el porqué de este fenómeno.

En esta tercera parte del trabajo demostramos que los dos linajes de *Typhimurium* ST 19 y 213 pueden adquirir y mantener el pA/C y el pSTV, y de acuerdo a los resultados obtenidos, la incapacidad de encontrar los dos plásmidos en una misma cepa en nuestra población, puede deberse más a limitantes en la transferencia lateral que a problemas de incompatibilidad o de estabilidad *per se*. Por otro lado, estos experimentos nos permitieron descubrir una compleja y muy interesante interacción entre el pA/C y el pX1, la cual no se ha reportado. Como resultado de esta interacción encontramos: 1) pA/C re-arreglados que continúan siendo no conjugativos, 2) pA/C co-integrados con el pX1 que son altamente conjugativos y 3) pX1 con el gen *bla*_{CMY-2} (Figura 12). Además, estos experimentos nos permitieron observar uno de los posibles mecanismos de dispersión del pA/C, de los cuales aún se conoce poco.

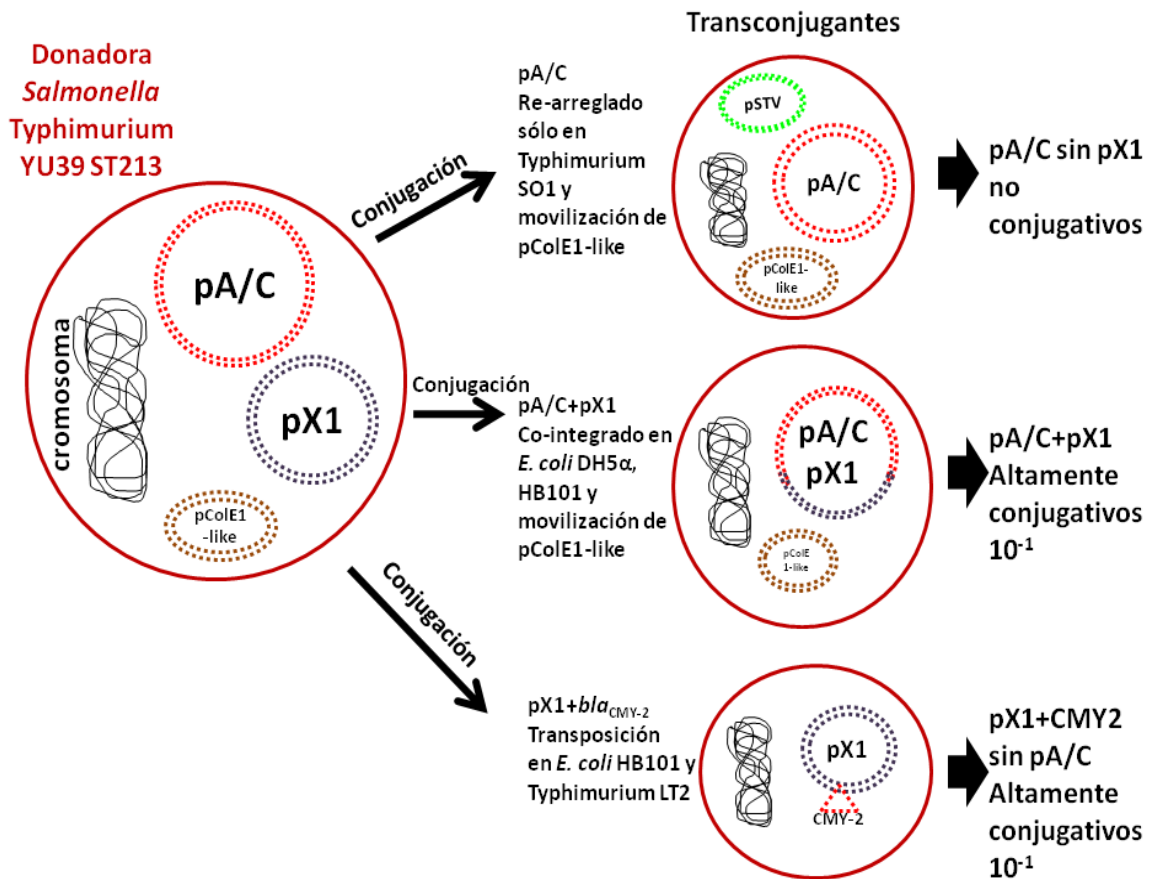


Figura 12. Resultados de la interacción entre el pA/C y el pX1 presentes en la cepa YU39. En el esquema se ilustran los tres diferentes tipos de transconjugantes recuperadas en las diferentes receptoras después de la conjugación. La selección para las transconjugantes fue con CRO (Tabla 3).

Antes de iniciar este trabajo se conocía que en Yucatán circulaba un clon del serovar Typhimurium multirresistente, incluyendo la resistencia a CRO determinada por *bla*_{CMY-2}. A partir de la colección del programa de vigilancia epidemiológica implementado por Zaidi y colaboradores decidimos evaluar la diversidad genética de la población de cepas de Typhimurium recuperadas en México. En este estudio descubrimos que a pesar de estudiar aislamientos de una serovar, ésta no es una población homogénea sino que al contrario se encuentra claramente subdivida en cuatro genotipos, dos de los cuales son predominantes en el país. Por un lado, se considera que el ST 19 es el linaje ancestral del serovar Typhimurium, de nuestra población y que se encuentra asociado a humanos y que porta el pSTV típico de este serovar. Por el otro, está el ST 213, que corresponde al clon *bla*_{CMY-2} mencionado anteriormente, que hasta la fecha sólo se ha reportado en México. El ST 213 se encuentra mayormente asociado a animales y porta el plásmido de resistencia pA/C, mas no el pSTV. Nosotros observamos que el ST 213 está reemplazando al ST 19 en la población. Por lo tanto, el éxito de este nuevo linaje ST 213 puede estar relacionado a la presencia del plásmido pA/C multirresistente. Al analizar estos pA/C en nuestra población, descubrimos que aún asociados a un linaje genético, existían dos tipos divergentes. El tipo I es el más abundante y disperso y su composición genética es similar a los pA/C secuenciados, mientras el tipo II es de menor tamaño y solo comparte aproximadamente un 30% con los pA/C secuenciados. Nosotros concluimos que estos plásmidos se originaron de un ancestro común, pero que han divergido por inserciones o deleciones de fragmentos de ADN. Los dos tipos de pA/C comparten la característica de no ser auto-transferibles. Sin embargo, encontramos una cepa de nuestra población (YU39), la cual además del pA/C CMY+ porta un plásmido del grupo IncX1 (pX1) altamente conjugativo. Mediante experimentos de conjugación con esta cepa a diferentes receptoras, descubrimos que el pA/C se moviliza mediante el pX1, a veces mediante co-integración con. Aunque la movilización entre plásmidos es un mecanismo común de transferencia horizontal, hasta la fecha no se ha reportado que el pA/C sea de tipo movilizable por co-integración. Estos experimentos de conjugación se realizaron con el objetivo de evaluar si una cepa ST 213 o ST 19 podían adquirir y mantener tanto el pSTV como el pA/C, ya que en nuestra población no observamos los dos plásmidos juntos en una cepa. Encontramos que tanto el ST 19 como el ST 213 pueden adquirir y mantener los dos plásmidos y que el hecho de no encontrarlos juntos se debe más a limitantes en su transferencia horizontal. Si observamos la situación desde un punto de vista más general, nosotros creemos que la asociación observada entre plásmido-genotipo, posiblemente favorece su adaptación a diferentes hospederos; es decir el ST 19 asociado a humanos y el ST 213 asociado con animales.

Por lo tanto, aunque portar los dos plásmidos parece no representar un costo en el crecimiento bacteriano, una cepa ST 19 con el pSTV y el pA/C pudiera ser favorecida en su supervivencia al ser multirresistente y sería más difícil de desplazar en la población por el ST 213. Por otro lado, la presencia de los dos plásmidos en una cepa ST213, además de favorecer la prevalencia de este genotipo en la población por la multirresistencia, probablemente sería más virulenta para los animales que para el humano y provocaría un problema de salud en el ámbito de producción animal. Deberán diseñarse estudios futuros para ampliar nuestro conocimiento acerca de la importancia de los plásmidos y las diferencias entre los dos genotipos.

13 Conclusiones

Durante mi formación doctoral trabajando con aislamientos mexicanos de Typhimurium, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- El análisis del genoma central y accesorio de cepas de Typhimurium mexicanas, utilizando metodologías de vanguardia en análisis de poblaciones, nos permitió definir claramente subgrupos genéticos (STs) dentro de ésta.
Para estos subgrupos, se encontraron asociaciones estadísticamente representativas como:
 - El pSTV se encontró únicamente en el ST 19.
 - El plásmido pA/C se detectó exclusivamente en el ST 213.
 - El integrón más abundante IP-1 (*dfrA12*, *orfF* y *aadA2*), es exclusivo del ST 213.
- La caracterización de los pA/C como elementos portadores de multirresistencia en la población ST 213 mostró que:
 - Existen dos tipos divergentes de pA/C: el tipo I (pA/C CMY+) predominante, el cual porta la región CMY y es de mayor tamaño (150kb), y el tipo II (pA/C CMY-) que es negativo para la región CMY y es de menor tamaño (100kb).
 - Los pA/C del linaje I presentan un gran número de re-arreglos, mientras que los del tipo II están conservados.
 - La región CMY en nuestros plásmidos se encuentra conservada entre ellos y con respecto a los IncA/C secuenciados.
 - Los dos tipos de pA/C tienen un origen común reciente y evolucionan por inserción o delección de segmentos de ADN, más que por mutaciones puntuales.
- Con respecto a si los genotipos ST 19 y ST 213 podían adquirir y mantener tanto el pSTV como el pA/C concluimos que:
 - El pA/C y el pSTV son plásmidos compatibles tanto en cepas de *E. coli* DH5 α como en los dos genotipos de Typhimurium, pero cada uno mostró limitantes en su capacidad para transferirse horizontalmente.
 - Por ejemplo, determinamos que los pA/C CMY+ presentes en Typhimurium ST 213 no son conjugativos.
 - Sin embargo, pX1 es capaz de movilizar al pA/C cuando se encuentran presentes en la misma donadora. En el 70% de los casos analizados los casos de co-transferencia se ligaron a fenómenos de co-integración.
 - El estudio de la prevalencia del pColE1-like mostró que está asociado a la presencia del pA/C tanto en los aislamientos ST 213 como en las transconjugantes analizadas.

Finalmente, el análisis de la diversidad genética en los aislamientos de un mismo serovar nos permitió identificar la importancia de los genes accesorios como plásmidos o genes de resistencia a antibióticos, no solo en la definición de subgrupos genéticos en la población, sino que también se encuentran asociados a un hospedero específico, lo que sugiere que las interacciones patógeno-hospedero están definidas por la totalidad del genoma bacteriano.

La mayor parte de los resultados arriba mencionados se publicaron en dos artículos (Wiesner et al., 2011, Wiesner et al., 2009), y el remanente se encuentra en un manuscrito en preparación y se detallan en el texto de esta tesis.

14 Perspectivas

Este trabajo aportó un estudio poblacional de Typhimurium en México utilizando tecnologías de vanguardia en esta área, lo que permitió la identificación del genotipo ST 213 reportado hasta la fecha solamente por nosotros. También aportó información acerca de la importancia del genoma accesorio como generador de variabilidad genética en esta población. Adicionalmente, se aportó un modelo de transferencia lateral para el grupo IncA/C novedoso en el área, mediante la compleja interacción entre el pA/C y un plásmido del grupo IncX1.

Todos los resultados obtenidos han generado varias perspectivas de trabajo, algunas de las cuales se continuaran en el grupo:

- Con respecto a la población de Typhimurium en México:
 1. Basados en el análisis de la colección de cepas que trabajamos, se escogieron 25 cepas para secuenciar su genoma completo como parte del proyecto “Genética y genómica de *Salmonella enterica*”. La secuencia de estos genomas nos ayudará a entender qué factores genéticos están involucrados en la divergencia entre el ST 213 y el ST 19; y si existe alguna diferencia a nivel de genes de virulencia entre los dos linajes. Adicionalmente, consideramos que estas secuencias nos ayudarán a seguir buscando la respuesta a la pregunta sobre el mecanismo que permite que los pA/C y pSTV se encuentren asociados a un genotipo particular. También como parte de este proyecto, se ha propuesto secuenciar diferentes plásmidos resultantes de este trabajo, i.e: el pA/C re-arreglado, el pA/C co-integrado con pX1 y el pX1 + región CMY.
- Con respecto a los plásmidos transconjugantes:
 1. Como parte del trabajo en progreso para el manuscrito que se enviará a publicación, se ha avanzado en la caracterización de los plásmidos pX1 que tienen la región CMY insertada. Como resultado, hemos encontrado variabilidad en su perfil de restricción, lo que sugiere varios re-arreglos también en estos plásmidos. También hemos observado que la presencia de la región CMY en este plásmido pX1 no afecta su alta eficiencia de conjugación (10^{-2}). Los esfuerzos también se han encaminado en identificar los sitios blancos de inserción de la región CMY para los cuales se han identificado dos regiones en el pX1.
 2. Utilizando la secuencia preliminar de la cepa YU39 facilitada por Rob Edwards (USDS), hemos logrado obtener una secuencia parcial de los plásmidos pA/C y pX1 y continuamos en la búsqueda de la secuencia del p100kb. A partir de estas secuencias podremos:
 - Comparar los plásmidos presentes en la cepa YU39 contra los pA/C y pX1 de las bases de datos públicas para analizar su variación.
 - Buscar si existen genes homólogos a TraT o TraS que estén ejerciendo un mecanismo de exclusión en la cepa YU39 para la conjugación exitosa del pSTV.

En caso de encontrar posibles candidatos, sería interesante realizar mutantes para evaluar su papel en este fenotipo.

3. Para tratar de entender detalladamente el fenómeno de movilización y la interacción entre los tres plásmidos (pA/C, pX1 y pColE1-like), sería interesante evaluar la funcionalidad de las relaxasas de los tres plásmidos y su interacción con la proteína acopladora (T4CP) del pX1 y con la región *oriT* de cada plásmido, teniendo en cuenta que estas dos proteínas son las primeras en interactuar en el modelo conocido de conjugación y que una mutante pX1 en el gen T4CP abate totalmente el fenómeno de movilización.

15 Referencias.

Salmonella MLST database. In., pp.

Achtman, M., (2012) Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*.

Ahmer, B. M., M. Tran & F. Heffron, (1999) The virulence plasmid of *Salmonella* Typhimurium is self-transmissible. *J. Bacteriol.* **181**: 1364-1368.

Allen, K. J. & C. Poppe, (2002) Occurrence and characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins mediated by beta-lactamase CMY-2 in *Salmonella* isolated from food-producing animals in Canada. *Can. J. Vet. Res.* **66**: 137-144.

Arlet, G., T. J. Barrett, P. Butaye, A. Cloeckert, M. R. Mulvey & D. G. White, (2006) *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes. Infect.* **8**: 1945-1954.

Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth & H. Giamarellou, (1996) Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**: 221-224.

Baumler, A. J., R. M. Tsois, T. A. Ficht & L. G. Adams, (1998) Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* **66**: 4579-4587.

Birren, B. & E. Lai, (1993) *Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide*. Academic Press, San Diego, CA.

Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts & M. R. Mulvey, (2001) Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* **183**: 5725-5732.

Brown, D. J., D. L. Baggesen, D. J. Platt & J. E. Olsen, (1999) Phage type conversion in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis caused by the introduction of a resistance plasmid of incompatibility group X (IncX). *Epidemiol. Infect.* **122**: 19-22.

Cabezón, E., E. Lanka & F. de la Cruz, (1994) Requirements for mobilization of plasmids RSF1010 and ColE1 by the IncW plasmid R388: *trwB* and RP4 *traG* are interchangeable. *J. Bacteriol.* **176**: 4455-4458.

Call, D. R., R. S. Singer, D. Meng, S. L. Broschat, L. H. Orfe, J. M. Anderson, D. R. Herndon, L. S. Kappmeyer, J. B. Daniels & T. E. Besser, (2010) blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 590-596.

Canton, R. & T. M. Coque, (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**: 466-475.

Carattoli, A., (2003) Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* **5**: 113-122.

Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins & E. J. Threlfall, (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**: 219-228.

Carattoli, A., V. Miriagou, A. Bertini, A. Loli, C. Colinon, L. Villa, J. M. Whichard & G. M. Rossolini, (2006) Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1145-1148.

Carattoli, A., F. Tosini, W. P. Giles, M. E. Rupp, S. H. Hinrichs, F. J. Angulo, T. J. Barrett & P. D. Fey, (2002) Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1269-1272.

Carmona, M., C. Balsalobre, F. Munoa, M. Mourino, Y. Jubete, F. De la Cruz & A. Juarez, (1993) *Escherichia coli hha* mutants, DNA supercoiling and expression of the haemolysin genes from the recombinant plasmid pANN202-312. *Mol. Microbiol.* **9**: 1011-1018.

CDC, D. o. b. a. m. d., PHILIS surveillance data, *Salmonella* annual summaries, (2005) The 30 most frequently reported *Salmonella* serotypes from Human sources reported to CDC in 2005. In., pp.

Couturier, M., F. Bex, P. Bergquist & W. K. Maas, (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395.

Crump, J. A., S. P. Luby & E. D. Mintz, (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull. World Health Organ.* **82**: 346-353.

Chen, C. Y., T. P. Strobaugh, Jr. & J. G. Frye, (2010) Characterization of small ColE1-like plasmids conferring kanamycin resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Newport. *Plasmid* **63**: 150-154.

Chiu, C. H., C. Chu & J. T. Ou, (2000) Lack of evidence of an association between the carriage of virulence plasmid and the bacteremia of *Salmonella typhimurium* in humans. *Microbiol. Immunol.* **44**: 741-748.

Chiu, C. H., T. Y. Lin & J. T. Ou, (1999) Prevalence of the virulence plasmids of nontyphoid *Salmonella* in the serovars isolated from humans and their association with bacteremia. *Microbiol. Immunol.* **43**: 899-903.

Chiu, C. H. & J. T. Ou, (1996) Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2619-2622.

Chiu, C. H., L. H. Su, C. H. Chu, M. H. Wang, C. M. Yeh, F. X. Weill & C. Chu, (2006) Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102, DT104, and U302 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 2354-2358.

Chu, C. & C. H. Chiu, (2006) Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. *Microbes. Infect.* **8**: 1931-1936.

Chu, C., Y. Feng, A. C. Chien, S. Hu, C. H. Chu & C. H. Chiu, (2008) Evolution of genes on the *Salmonella* Virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis. *Genomics* **92**: 339-343.

Chu, C., S. F. Hong, C. Tsai, W. S. Lin, T. P. Liu & J. T. Ou, (1999) Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars typhimurium, enteritidis, choleraesuis, and dublin. *Infect. Immun.* **67**: 2611-2614.

Daniels, J. B., D. R. Call & T. E. Besser, (2007) Molecular epidemiology of *bla*_{CMY-2} plasmids carried by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from cattle in the Pacific Northwest. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 8005-8011.

Datsenko, K. A. & B. L. Wanner, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 6640-6645.

Davis, M. A., D. D. Hancock & T. E. Besser, (2002) Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. *J. Lab. Clin. Med.* **140**: 135-141.

Davis, M. A., D. D. Hancock, T. E. Besser, D. H. Rice, J. M. Gay, C. Gay, L. Gearhart & R. DiGiacomo, (1999) Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from humans and cattle in the northwestern United States, 1982-1997. *EID* **5**: 802-806.

de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer & E. L. Zechner, (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 18-40.

Dunne, E. F., P. D. Fey, P. Kludt, R. Reporter, F. Mostashari, P. Shillam, J. Wicklund, C. Miller, B. Holland, K. Stamey, T. J. Barrett, J. K. Rasheed, F. C. Tenover, E. M. Ribot & F. J. Angulo, (2000) Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *Jama* **284**: 3151-3156.

Enright, M. C. & B. G. Spratt, (1999) Multilocus sequence typing. *Trends. Microbiol.* **7**: 482-487.

Fakhr, M. K., L. K. Nolan & C. M. Logue, (2005) Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 2215-2219.

Fernandez-Alarcon, C., R. S. Singer & T. J. Johnson, (2011) Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* **6**: e23415.

Fey, P. D., T. J. Safraneck, M. E. Rupp, E. F. Dunne, E. Ribot, P. C. Iwen, P. A. Bradford, F. J. Angulo & S. H. Hinrichs, (2000) Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *N. Engl. J. Med.* **342**: 1242-1249.

Fierer, J., (2001) Extra-intestinal *Salmonella* infections: the significance of *spv* genes. *Clin. Infect. Dis.* **32**: 519-520.

Fierer, J., M. Krause, R. Tauxe & D. Guiney, (1992) *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J. Infect. Dis.* **166**: 639-642.

Fisher, I. S. T. & Enter-Net, (2004) International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003 - A surveillance report from the Enter-Net international surveillance network. *Euro. Surveill.* **9**: 45-47.

Fluit, A. C., (2005) Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**: 1-11.

Fricke, W. F., T. J. Welch, P. F. McDermott, M. K. Mammel, J. E. LeClerc, D. G. White, T. A. Cebula & J. Ravel, (2009) Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *J. Bacteriol.* **191**: 4750-4757.

Frost, L. S. & G. Koraimann, (2010) Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiol.* **5**: 1057-1071.

Garcillan-Barcia, M. P. & F. de la Cruz, (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**: 1-18.

Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia & F. de la Cruz, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 657-687.

Giles, W. P., A. K. Benson, M. E. Olson, R. W. Hutkins, J. M. Whichard, P. L. Winokur & P. D. Fey, (2004) DNA sequence analysis of regions surrounding bla_{CMY-2} from multiple *Salmonella* plasmid backbones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 2845-2852.

Grudniak, A. M., A. Kraczkiewicz-Dowjat, K. I. Wolska & J. Wild, (2007) Conjugal transfer of plasmid R6K gamma ori minireplicon derivatives from *Escherichia coli* to various genera of pathogenic bacteria. *Curr. Microbiol.* **55**: 549-553.

Guerra, B., E. Junker, A. Miko, R. Helmuth & M. C. Mendoza, (2004) Characterization and localization of drug resistance determinants in multidrug-resistant, integron-carrying *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains. *Microb. Drug Resist.* **10**: 83-91.

Guerra, B., S. Soto, R. Helmuth & M. C. Mendoza, (2002) 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.

Guiney, D. G. & J. Fierer, (2011) The Role of the spv Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Front. Microbiol.* **2**: 129.

Gulig, P. A. & R. Curtiss, 3rd, (1987) Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **55**: 2891-2901.

Gulig, P. A., H. Danbara, D. G. Guiney, A. J. Lax, F. Norel & M. Rhen, (1993) Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* **7**: 825-830.

Gulig, P. A., T. J. Doyle, J. A. Hughes & H. Matsui, (1998) Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* **66**: 2471-2485.

Gupta, A., J. Fontana, C. Crowe, B. Bolstorff, A. Stout, S. Van Duyne, M. P. Hoekstra, J. M. Whichard, T. J. Barrett & F. J. Angulo, (2003) Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. *J. Infect. Dis.* **188**: 1707-1716.

Hansen, L. H., M. Bentzon-Tilia, S. Bentzon-Tilia, A. Norman, L. Rafty & S. J. Sorensen, (2011) Design and synthesis of a quintessential self-transmissible IncX1 plasmid, pX1.0. *PLoS One* **6**: e19912.

Hensel, M., (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**: 95-102.

Horton, J. M., R. F. Sing & S. G. Jenkins, (1999) Multidrug-resistant *Salmonella* associated with AmpC hyperproduction. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1348.

Jacobsen, A., R. S. Hendriksen, F. M. Aaresturp, D. W. Ussery & C. Friis, (2011) The *Salmonella enterica* pan-genome. *Microb. Ecol.* **62**: 487-504.

Jones, C. & J. Stanley, (1992) *Salmonella* plasmids of the pre-antibiotic era. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 189-197.

Jones, C. S., D. J. Osborne & J. Stanley, (1993) Molecular comparison of the IncX plasmids allows division into IncX1 and IncX2 subgroups. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 735-741.

Kang, M. S., T. E. Besser & D. R. Call, (2006) Variability in the region downstream of the *bla*_{CMY-2} beta-lactamase gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* plasmids. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**: 1590-1593.

Koeck, J. L., G. Arlet, A. Philippon, S. Basmaciogullari, H. V. Thien, Y. Buisson & J. D. Cavallo, (1997) A plasmid-mediated CMY-2 beta-lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella* Senftenberg. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 255-260.

Kotetishvili, M., O. C. Stine, A. Kreger, J. G. Morris, Jr. & A. Sulakvelidze, (2002) Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1626-1635.

Kropinski, A. M., A. Sulakvelidze, P. Konczy & C. Poppe, (2007) *Salmonella* phages and prophages-genomics and practical aspects. *Methods Mol. Biol.* **394**: 133-175.

Kruger, T., D. Szabo, K. H. Keddy, K. Deeley, J. W. Marsh, A. M. Hujer, R. A. Bonomo & D. L. Paterson, (2004) Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**: 4263-4270.

Lesnick, M. L., N. E. Reiner, J. Fierer & D. G. Guiney, (2001) The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **39**: 1464-1470.

Levesque, C., L. Piche, C. Larose & P. H. Roy, (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 185-191.

Levin, B. R. & C. T. Bergstrom, (2000) Bacteria are different: observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6981-6985.

Li, W. C., F. Y. Huang, C. P. Liu, L. C. Weng, N. Y. Wang, N. C. Chiu & C. S. Chiang, (2005) Ceftriaxone resistance of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in Northern Taiwan attributable to production of CTX-M-14 and CMY-2 beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3237-3243.

Li, Z., H. Hiasa, U. Kumar & R. J. DiGate, (1997) The *traE* gene of plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *J. Biol. Chem.* **272**: 19582-19587.

Liebana, E., M. Gibbs, C. Clouting, L. Barker, F. A. Clifton-Hadley, E. Pleydell, B. Abdalhamid, N. D. Hanson, L. Martin, C. Poppe & R. H. Davies, (2004) Characterization of beta-lactamases responsible for resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains from food-producing animals in the United Kingdom. *Microb. Drug Resist.* **10**: 1-9.

Lindsey, R. L., P. J. Fedorka-Cray, J. G. Frye & R. J. Meinersmann, (2009) Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1908-1915.

Llanes, C., P. Gabant, M. Couturier, L. Bayer & P. Plesiat, (1996) Molecular analysis of the replication elements of the broad-host-range RepA/C replicon. *Plasmid* **36**: 26-35.

M'Zali, F. H., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, M. Denton, N. J. Todd & P. M. Hawkey, (1997) Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Leeds hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**: 823-831.

Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman & B. G. Spratt, (1998) 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.

Matsui, H., C. M. Bacot, W. A. Garlington, T. J. Doyle, S. Roberts & P. A. Gulig, (2001) Virulence plasmid-borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J. Bacteriol.* **183**: 4652-4658.

Mazurkiewicz, P., J. Thomas, J. A. Thompson, M. Liu, L. Arbibe, P. Sansonetti & D. W. Holden, (2008) SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol. Microbiol.* **67**: 1371-1383.

McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston & R. K. Wilson, (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**: 852-856.

Miriagou, V., R. Filip, G. Coman & L. S. Tzouveleakis, (2002) Expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains in Romania. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4334-4336.

Molbak, K., (2005) Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **41**: 1613-1620.

Nakaya, H., A. Yasuhara, K. Yoshimura, Y. Oshihoi, H. Izumiya & H. Watanabe, (2003) Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 255-257.

Navarro, F., E. Perez-Trallero, J. M. Marimon, R. Aliaga, M. Gomariz & B. Mirelis, (2001) CMY-2-producing *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* strains isolated in Spain (October 1999-December 2000). *J. Antimicrob. Chemother.* **48**: 383-389.

Ng, L. K., M. R. Mulvey, I. Martin, G. A. Peters & W. Johnson, (1999) Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 3018-3021.

Norman, A., L. H. Hansen, Q. She & S. J. Sorensen, (2008) Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* **60**: 59-74.

Norman, A., L. H. Hansen & S. J. Sorensen, (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**: 2275-2289.

Novick, R. P., (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**: 381-395.

Nuñez, B., P. Avila & F. de la Cruz, (1997) Genes involved in conjugative DNA processing of plasmid R6K. *Mol. Microbiol.* **24**: 1157-1168.

Ochman, H., J. G. Lawrence & E. A. Groisman, (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.

Olsen, J. E., D. J. Brown, L. E. Thomsen, D. J. Platt & M. S. Chadfield, (2004) Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. *Microb. Pathog.* **36**: 337-347.

Ong, C. L., S. A. Beatson, A. G. McEwan & M. A. Schembri, (2009) Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 6783-6791.

Ong, C. L., G. C. Ulett, A. N. Mabbett, S. A. Beatson, R. I. Webb, W. Monaghan, G. R. Nimmo, D. F. Looke, A. G. McEwan & M. A. Schembri, (2008) Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **190**: 1054-1063.

Paniagua, G. L., E. Monroy, O. Garcia-Gonzalez, J. Alonso, E. Negrete & S. Vaca, (2007) Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **6**: 17.

Platt, D. J., J. Taggart & K. A. Heraghty, (1988) Molecular divergence of the serotype-specific plasmid (pSLT) among strains of *Salmonella typhimurium* of human and veterinary origin and comparison of pSLT with the serotype specific plasmids of *S. enteritidis* and *S. dublin*. *J. Med. Microbiol.* **27**: 277-284.

Poole, T. L., T. S. Edrington, D. M. Brichta-Harhay, A. Carattoli, R. C. Anderson & D. J. Nisbet, (2009) Conjugative Transferability of the A/C Plasmids from *Salmonella enterica* Isolates That Possess or Lack bla(CMY) in the A/C Plasmid Backbone. *Foodborne Pathog. Dis.* **6**: 1185-1194.

Poppe, C., L. C. Martin, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, P. Boerlin, S. A. McEwen, J. F. Prescott & K. R. Forward, (2005) Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the turkey poult intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1184-1192.

Rabsch, W., H. L. Andrews, R. A. Kingsley, R. Prager, H. Tschape, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2002a) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect. Immun.* **70**: 2249-2255.

Rabsch, W., S. Miold, W. D. Hardt & H. Tschape, (2002b) The dual role of wild phages for horizontal gene transfer among *Salmonella* strains. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **115**: 355-359.

- Rankin, S. C., H. Aceto, J. Cassidy, J. Holt, S. Young, B. Love, D. Tewari, D. S. Munro & C. E. Benson, (2002) Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 4679-4684.
- Rotger, R. & J. Casadesus, (1999) The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int. Microbiol.* **2**: 177-184.
- Rychlik, I., D. Gregorova & H. Hradecka, (2006) Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet. Microbiol.* **112**: 1-10.
- Salyers, A. & D. Whitt, (2002) *Bacterial Pathogenesis. A molecular approach.*, p. 539.
- Sambrook, J. & D. W. Russell, (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandvang, D., F. M. Aarestrup & L. B. Jensen, (1998) Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**: 37-41.
- Sekizuka, T., M. Matsui, K. Yamane, F. Takeuchi, M. Ohnishi, A. Hishinuma, Y. Arakawa & M. Kuroda, (2011) Complete sequencing of the *bla*_(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One* **6**: e25334.
- Selvaratnam, S. & M. A. Gealt, (1993) Transcription of ColE1Ap *mbeC* induced by conjugative plasmids from twelve different incompatibility groups. *J. Bacteriol.* **175**: 6982-6987.
- Silva, C. & M. Wiesner, (2009) An introduction to systematics, natural history and population genetics of *Salmonella*. In: *Molecular biology and molecular epidemiology of Salmonella infections*. J. J. Calva (ed). India: Research Signpost, pp. 1-17.
- Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, M. V. Francia, E. P. Rocha & F. de la Cruz, (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 434-452.
- Sorensen, S. J., M. Bailey, L. H. Hansen, N. Kroer & S. Wuertz, (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 700-710.
- Su, L. H., C. H. Chiu, C. Chu & J. T. Ou, (2004) Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 546-551.
- Swaminathan, B., T. J. Barrett, S. B. Hunter & R. V. Tauxe, (2001) PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 382-389.

Threlfall, E. J., (2002) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 141-148.

Tock, M. R. & D. T. Dryden, (2005) The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 466-472.

Torpdahl, M., M. N. Skov, D. Sandvang & D. L. Baggesen, (2005) Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *J. Microbiol. Methods* **63**: 173-184.

Warren, G. J., M. W. Saul & D. J. Sherratt, (1979) ColE1 plasmid mobility: essential and conditional functions. *Mol. Gen. Genet.* **170**: 103-107.

Welch, T. J., W. F. Fricke, P. F. McDermott, D. G. White, M. L. Rosso, D. A. Rasko, M. K. Mammel, M. Eppinger, M. J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J. E. Leclerc, J. M. Hinshaw, L. E. Lindler, T. A. Cebula, E. Carniel & J. Ravel, (2007) Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS ONE* **2**: e309.

WHO, (2005)

http://thor.dfvf.dk/portal/page?_pageid=53,46334&_dad=portal&_schema=PORTAL In: Fact Sheet., pp.

Wiesner, M., E. Calva, M. Fernandez-Mora, M. A. Cevallos, F. Campos, M. B. Zaidi & C. Silva, (2011) *Salmonella* Typhimurium ST213 is associated with two types of IncA/C plasmids carrying multiple resistance determinants. *BMC Microbiol.* **11**: 9.

Wiesner, M., M. B. Zaidi, E. Calva, M. Fernandez-Mora, J. J. Calva & C. Silva, (2009) Association of virulence plasmid and antibiotic resistance determinants with chromosomal multilocus genotypes in Mexican *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains. *BMC Microbiol.* **9**: 131.

Winokur, P. L., A. Brueggemann, D. L. DeSalvo, L. Hoffmann, M. D. Apley, E. K. Uhlenhopp, M. A. Pfaller & G. V. Doern, (2000) Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2777-2783.

Winokur, P. L., R. Canton, J. M. Casellas & N. Legakis, (2001) Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl 2**: S94-103.

Yamada, Y., M. Yamada & A. Nakazawa, (1995) A ColE1-encoded gene directs entry exclusion of the plasmid. *J. Bacteriol.* **177**: 6064-6068.

Yan, J. J., W. C. Ko, C. H. Chiu, S. H. Tsai, H. M. Wu & J. J. Wu, (2003) Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded CMY-2-like cephalosporinase, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 323-328.

Zaidi, M. B., J. J. Calva, M. T. Estrada-Garcia, V. Leon, G. Vazquez, G. Figueroa, E. Lopez, J. Contreras, J. Abbott, S. Zhao, P. McDermott & L. Tollefson, (2008) Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 429-435.

Zaidi, M. B., V. Leon, C. Canche, C. Perez, S. Zhao, S. K. Hubert, J. Abbott, K. Blickenstaff & P. F. McDermott, (2007) Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant blaCMY-2 *Salmonella* Typhimurium in Mexico. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 398-401.

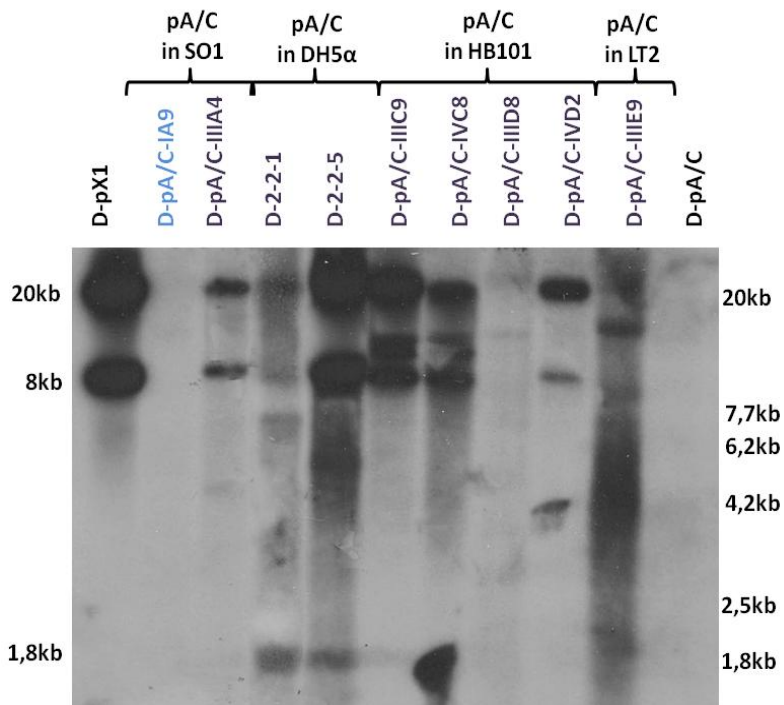
Zaidi, M. B., P. F. McDermott, P. Fedorka-Cray, V. Leon, C. Canche, S. K. Hubert, J. Abbott, M. Leon, S. Zhao, M. Headrick & L. Tollefson, (2006) Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin. Infect. Dis.* **42**: 21-28.

Zhang, S., R. A. Kingsley, R. L. Santos, H. Andrews-Polymenis, M. Raffatellu, J. Figueiredo, J. Nunes, R. M. Tsois, L. G. Adams & A. J. Baumler, (2003) Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype typhimurium-induced diarrhea. *Infect. Immun.* **71**: 1-12.

ANEXOS

Tabla S1. Lista de oligos utilizados en este estudio.

Ensayo	Oligo	Gen	Secuencia 5' - 3'	Tamaño bp	Referencia
Tamizaje pSTV	SpvC-1	<i>spvC</i>	ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA	550	(Wiesner et al., 2009)
	SpvC-2		TGT CTC TGC ATT TCG CCA TCA		
	traT-F	<i>traT</i>	GAT GGT TAC ACT GGT CAG	500	
	traT-R		TCT GAG ATC TGT ACG TCG		
Mutante para <i>spvC::Km</i>	Spvh1p15'	<i>spvC</i>	AATTTCAACTCCTTGACAACCAATGCGGAAGATGCCGGTGTAGGC TGGAGCTGCTT	1500	Este estudio
	Spvh2p23'		TAAAGCCTGTCTCTGCATTTGCCCACCATCACGCCCACTTCATATGAATAT CCTCCTTAGTTC		
Tamizaje pA/C	CMY-F	<i>cmy-2</i>	ATA ACC ACC CAG TCA CGC	600	(Wiesner et al., 2009)
	CMY-R		CAG TAG CGA GAC TGC GCA		
	R-7 F	R-7	CAG CAC AAA CAT CTT CCC AGA C	1500	
	R-7 R		GGG TAA CAC CGC CAA CTC TTA C		
Tamizaje pX1	stbD5-F	<i>oriX1</i>	CTCATAAGCCCTCCGCTTGCT	2000	Este estudio
	pir3-R		TTTCACTGCAAAACATTTCTTACGC		
	DTOP0III5-F	Tiso	AAAGACAAAAAAGATGAACATGGC	800	Este estudio
	HH3 II-R		TGATAAAGGCAGCTTGTAACGGT		
	TaxC-F	<i>taxC</i>	CTGCGTAAACTGCGCCATTCCGC	1000	Este estudio
	TaxC-R		AGTCAGCTTTGCTCACAAAGTCA		
	TaxB-F	<i>taxB</i>	TGTTGAGCGTCCCGGCTCT	1500	Este estudio
	TaxB-R		CGATACTGATATTCTCGTCGGGGCA		
	ddp3-F	<i>ddp3</i>	CGTCTCTGACGCCATTCCGCA	500	Este estudio
	ddp3-R		TTCCAGCTTATCGCTGTAAGCAA		
	pOU_46	Intergénica 46-47	TACGCTGCCTGTACCCACGG	600	Este estudio
	pOU_47		TCTCAGGGCTGTGCTCGCCA		
	Mutante en pX1	ydfA_p1	<i>ydfA</i>	GAAGCTGGGTTTTCCGGCAAGGGCTAAGAAGTAAAAACAAAGCAGGAA TGTAGGCTGGAG	1500
ydfA_p2		AGTCAGTTCCGCTCATAATTAATCCTCTGTGTTAATGGAGCTACTTCCACAT ATGAATATCTTTAG			
TaxB_p1		<i>taxB</i>	TGACTATTTAGAAAAGTGAAGGAGTGATTATGTCTTTAAAACCTCCATG TAGGCTGGAGCTGCTTCG	1500	
TaxB_p2			GGAAAAGAATACTGATCATAAGTATTTTTTTCATAATAAACCTCAGACA TATGAATATCTTTAG		
Secuenciación ColE1-like	mobA5' I	<i>mobA</i>	TCTGGCGTGG CCCGTCAATG	Se utilizaron diferentes combinaciones de estos oligos para secuenciar todo el plásmido.	Este estudio
	mobA3' I		GATCAGTTTTCG CACGTTCCAG		
	mobAIII5'		GGGAACTCATTGATGCCACG		
	mobB5' I	<i>mobB</i>	CAGAGACGCT ATCAGCGAACAA		Este estudio
	mobB3' II		TGAGCTGCGTGCTCACGGTG		
	mobIV5'		TAACCTCATTCTAATGACTCTGT		
	ORIV3'	<i>oriV</i>	GGACTATAAAGATACCAGGCGTT		Este estudio
	oriV5'-I		CAGTGGCGTTTTTACGTGCTTT		
	ROM3'-I	<i>Rom</i>	GCCTCGCACGCTTCGGCGAT		Este estudio
	oriT5'-I	<i>oriT</i>	CGTGACTGGGTCAGGGCTGC		Este estudio
	orfX5'-I	<i>orfX</i>	CTGTATCAAAAATAAATGCAGCCAT		Este estudio
orfX3'-I	AGTCTGAGTTAATAAAAAACATATC				
Vector pUC18	LacZ-f	Inserto	GGTTTTCCAGTCACGACGTT		
	LacZ-r	LacZ	GAATTGTGAGCGGATAACAATTC		



Anexo 1. Hibridación de los D-pA/C-(transconjugantes) con el D-pX1 marcado radioactivamente. En la imagen se puede observar las bandas de 8 y 20 Kb que dan positivas para el pX1 en los plásmidos analizados además de las bandas adicionales mencionadas en la Figura 7.