

Costo Biológico de la expresión de  $\beta$ -lactamasas en  
*Salmonella enterica* serovar Typhimurium



Tesis de Maestría  
PEDECIBA  
Área Biología, Sub-área Microbiología

Lic. Nicolás Cordeiro García

Orientador: Dra. Lucía Yim Leone

Dpto. de Bacteriología y Virología,  
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.  
Montevideo, Uruguay.

TESIS DE MAESTRÍA

PEDECIBA

ÁREA BIOLOGÍA, SUB-ÁREA MICROBIOLOGÍA

Tribunal: Fernanda Azpiroz  
Gabriel Gutkind  
Pablo Zunino

## AGRADECIMIENTOS:

Al ponerme a escribir estas líneas, mirar para atrás y pensar en todas aquellas personas que directa o indirectamente me acompañaron a largo de este (tortuoso) camino, me surge la duda sobre el orden en el cual deberían figurar los agradecimientos; supongo que lo correcto sería seguir un orden cronológico. En primer lugar a mi superior directo, el Dr. Rafael Vignoli, por ayudarme a dar con el tema de esta tesis, por iniciar el diálogo con el Dr. Alejandro Chabalgoity para encontrar un tutor para mi maestría y por la ayuda cuando las cosas parecían no salir del modo planificado. Quiero agradecer al Dr. Chabalgoity por aceptarme como maestrando, permitirme disponer de las facilidades dentro de su laboratorio y por asignarme a la Dra. Lucía Yim como tutora “oficial” de mi maestría. Debo quitarme el sombrero ante la Dra. Yim por la ENORME paciencia que tuvo para conmigo a pesar de haberme hecho “acreedor a la pena de muerte” en varias ocasiones. Debo agradecerle además por la transferencia de conocimiento y por lo enriquecedor de las reuniones ya fueran para planificar actividades o para la discusión de resultados. No puedo olvidarme de los Dres. Juan. A. Ayala y Marina González, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, por permitirme dar los primeros pasos de la parte experimental dentro de su laboratorio. Quiero darle las gracias a la Dra. Laura Betancor, y del otro lado del “charco” a la Lic. Daniela Cejas por participar muy activamente en lo referente al estudio de las cepas de *S. Typhimurium* portadoras del gen *bla<sub>CMY-2</sub>*. Agradezco también a la Dra. Gabriela Kramer por oficiar de revisor externo del proyecto y en tal carácter ayudarme en la elaboración del mismo, y también al Dr. Pablo Power por tomarse el tiempo, estando de licencia, para responder a mis reiteradas consultas sobre cinética enzimática. Vayan también mis agradecimientos a las investigadoras e investigadores del laboratorio del Dr. Chabalgoity por tolerar mi presencia dentro de sus instalaciones, y al Dr Juan. M Marquesi por la secuenciación del plásmido pSTM709.

Por último, pero no menos importante quiero darle las gracias (y pedir disculpas) a mis compañeros de trabajo por tener que bancar mi reiterado mal humor!

Dedicado a la memoria de mi gran amiga Rosario Taroco, si no fuese por ella no estaría hoy aquí.

How I wish you were here!

## 1. ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ÍNDICE</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2. ABREVIATURAS</b>   | <b>8</b>  |
| <b>3. RESUMEN</b>  | <b>9</b>  |
| <b>4. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>10</b> |
| 4.1. <i>Salmonella</i> spp   | <b>10</b> |
| 4.1.1. Patogenia de la infección por <i>Salmonella</i> tifoidea                  | <b>12</b> |
| 4.1.2. Patogenia de la enteritis inducida por <i>Salmonella</i> no tifoidea      | <b>13</b> |
| 4.2. Tratamiento de las infecciones por <i>Salmonella</i> spp.                   | <b>16</b> |
| 4.3. Resistencia a los antibióticos  | <b>16</b> |
| 4.4. Costo biológico de la resistencia a los antibióticos                        | <b>17</b> |
| 4.4.1. Costo biológico de la resistencia mediada por ADN cromosómico             | <b>18</b> |
| 4.4.2. Costo biológico de la resistencia mediada por ADN extracromosómico        | <b>19</b> |
| 4.5. Atenuación del costo biológico impuesto por la resistencia                  | <b>20</b> |
| 4.6. Resistencia a los $\beta$ -lactámicos                                       | <b>21</b> |
| 4.6.1. Modificación de las PBPs  | <b>22</b> |
| 4.6.2. Producción de $\beta$ -lactamasas   | <b>22</b> |
| 4.7. Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos en <i>Salmonella</i> spp.   | <b>24</b> |
| <b>5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>26</b> |
| <b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>27</b> |
| <b>PARTE I</b>   |           |
| 6.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo                            | <b>27</b> |
| 6.2. Obtención de ADN genómico   | <b>28</b> |
| 6.3. Construcción de las cepas productoras de VIM-2 y OXA-66 inducibles          | <b>29</b> |
| 6.3.1 Transformación de las construcciones genéticas                             | <b>30</b> |
| 6.3.2. Inactivación del gen <i>bla</i> codificado en el vector pBAD22            | <b>31</b> |
| 6.4. Construcción de las cepas productoras constitutivas de VIM-2 y OXA-66       | <b>31</b> |
| 6.5. Obtención de extractos proteicos de las cepas LVR45 y LVR46                 | <b>35</b> |
| 6.6. Determinación de la actividad $\beta$ -lactamasa de los extractos proteicos | <b>36</b> |
| 6.7. Determinación del perfil de resistencia de las cepas LVR45 y LVR46          | <b>36</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.8. Determinación de alteraciones macroscópicas por la expresión de $\beta$ -lactamasas  | 36        |
| 6.9. Determinación de la movilidad de las cepas transformadas   | 37        |
| 6.10. Determinación de la cinética de crecimiento   | 37        |
| 6.11. Evaluación de la invasividad  | 38        |
| 6.11.1. Determinación del número de células viables   | 38        |
| 6.11.2. Determinación de la viabilidad en EMEM y susceptibilidad a la gentamicina   | 38        |
| 6.11.3. Ensayos de invasividad celular  | 39        |
| 6.12. Determinación de los niveles de expresión de <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> y <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>                       | 40        |
| 6.12.1. Extracción de ARN   | 40        |
| 6.12.2. Tratamiento con DNasa   | 40        |
| 6.12.3. Transcripción reversa (RT)  | 41        |
| 6.12.4. PCR en tiempo real  | 41        |
| 6.12.4.1. Cebadores   | 41        |
| 6.12.4.2. PCR   | 42        |
| 6.13. Análisis del efecto de la síntesis de <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> y <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> en la estabilidad plasmídica | 42        |
| <b>PARTE II</b>   |           |
| 6.14. Estudios de <i>fitness</i> en <i>Salmonella</i> productora de AmpC  | 43        |
| 6.14.1. Determinación del perfil de resistencia   | 44        |
| 6.14.2. Identificación del gen <i>ampC</i>  | 44        |
| 6.14.3. Ensayos de conjugación  | 45        |
| 6.14.4. Caracterización plasmídica  | 45        |
| 6.14.4.1 Extracción del plásmido de resistencia pSTM709   | 45        |
| 6.14.4.2 Secuenciación y anotación de pSTM709   | 46        |
| 6.14.5. Tipificación molecular de los aislamientos  | 47        |
| 6.14.5.1. PFGE  | 47        |
| 6.14.5.2. MLST  | 47        |
| 6.14.6. Búsqueda de genes de virulencia   | 47        |
| 6.14.7. Evaluación del <i>fitness</i> de STM709 y STM910  | 48        |
| 6.14.8. Análisis del lipopolisacárido   | 48        |
| 6.14.9. PCR cuantitativa en tiempo real   | 49        |
| 6.15. Análisis estadístico  | 49        |
| <b>7. RESULTADOS</b>  | <b>50</b> |
| <b>PARTE I</b>  |           |

|  |    |
|--|----|
| 7.1. Efecto de la expresión inducible de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> sobre el <i>fitness</i> de <i>S. Typhimurium</i> SL1344  | 50 |
| 7.1.1. Perfil de resistencia   | 51 |
| 7.1.2. Análisis de la producción de VIM-2 y OXA-66 mediante SDS-PAGE   | 51 |
| 7.1.3 Actividad enzimática de los extractos proteicos  | 52 |
| 7.1.4 Determinación de la síntesis de β-lactamasas mediante real-time PCR  | 53 |
| 7.1.5. Efecto de la síntesis de β-lactamasas en la morfología macroscópica   | 56 |
| 7.1.5.1 Efecto de la síntesis de β-lactamasas en la morfología celular   | 57 |
| 7.1.6. Efecto de la producción de VIM-2 y OXA-66 en la movilidad bacteriana  | 57 |
| 7.1.7. Efecto de la expresión de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> sobre la cinética de crecimiento de <i>S. Typhimurium</i> SL1344 | 58 |
| 7.1.8. Efecto de la expresión de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> en la invasividad de <i>S. Typhimurium</i> SL1344                | 59 |
| 7.1.9. Efecto de la síntesis de OXA-66 y VIM-2 en la estabilidad plasmídica  | 60 |
| 7.2. Efecto de la expresión constitutiva de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> en el <i>fitness</i> bacteriano  | 61 |
| 7.2.1. Perfil de resistencia   | 61 |
| 7.2.2. Estudios de qRT-PCR   | 61 |
| 7.2.3. Ensayos de movilidad  | 62 |
| 7.2.4. Cinética de crecimiento   | 63 |
| 7.2.5. Invasividad en células Caco-2   | 63 |
| <b><u>PARTE II</u></b>   |    |
| 7.3. Estudios de <i>fitness</i> en <i>Salmonella</i> productora de CMY-2   | 64 |
| 7.3.1. Perfil de resistencia   | 64 |
| 7.3.2. Caracterización de <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>  | 64 |
| 7.3.3. Estudio de plásmidos portadores de <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>  | 65 |
| 7.3.3.1. Análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido pSTM709  | 65 |
| 7.3.4. Tipificación molecular de STM709 y STM910   | 67 |
| 7.3.5. Búsqueda de factores de virulencia  | 67 |
| 7.3.6. Estudios de movilidad   | 68 |
| 7.3.7. Estudios de invasividad   | 69 |

---

|   |            |
|---|------------|
| 7.3.8. Análisis del LPS   | 70         |
| 7.3.9. Estudios de qRT-PCR  | 70         |
| <b>8. DISCUSIÓN</b>   | <b>71</b>  |
| 8.1. Costo biológico de la expresión de VIM-2 y OXA-66                        | 72         |
| 8.2. Costo biológico asociado a la expresión de CMY-2                         | 79         |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>  | <b>86</b>  |
| <b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>88</b>  |
| <b>11. ANEXOS</b>   |            |
| <b>Anexo I: Soluciones de Trabajo</b>   | <b>100</b> |
| <b>Anexo II: Anotación parcial del plásmido pSTM709</b>                       | <b>102</b> |
| <b>Anexo III: Análisis Bioinformáticos <i>post hoc</i></b>                    | <b>106</b> |
| <b>Anexo IV: Publicación de los resultados parciales de la presente tesis</b> | <b>112</b> |

## 2. ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| A260              | Absorbancia a 260 nm   |
| Amp               | Ampicilina   |
| ANOVA             | Análisis de varianza de un factor                                    |
| Ara               | L-arabinosa  |
| BLEE              | $\beta$ -lactamasa de espectro extendido                             |
| CIM               | Concentración inhibitoria mínima                                     |
| C <sub>T</sub>    | Ciclo umbral ( <i>threshold cycle</i> )                              |
| EMEM              | Medio mínimo esencial de Eagle                                       |
| Glu               | D-glucosa  |
| LB                | Medio Luria-Bertani  |
| LPS               | Lipopolisacárido   |
| MOI               | Multiplicidad de infección   |
| OD <sub>600</sub> | Densidad óptica a 600 nm   |
| ON                | Cultivo <i>overnight</i> (de un día para el otro)                    |
| PBP               | Proteína de unión a penicilina ( <i>penicillin-binding protein</i> ) |
| PBS               | Solución tampón fosfato salino                                       |
| PCR               | Reacción en cadena de la polimerasa                                  |
| PFGE              | Electroforesis en campo pulsado                                      |
| qPCR              | PCR cuantitativa   |
| RPM               | Revoluciones por minuto  |
| RT                | Retrotranscripción   |
| SNT               | <i>Salmonella</i> no tifoidea  |
| TA                | Temperatura ambiente   |
| TBE               | Solución tampón Tris-Borato-EDTA                                     |
| T <sub>m</sub>    | Temperatura de fusión  |
| TSA               | Tripticasa Soya Agar   |
| UFC               | Unidades formadoras de colonias                                      |
| WT                | Cepa salvaje ( <i>wild type</i> )                                    |

### 3. RESUMEN

El género *Salmonella*, está integrado por serovariedades patógenas responsables de una variedad de cuadros clínicos en humanos y animales. La gran diseminación de *Salmonella* en el ambiente, su prevalencia en aumento en la cadena alimenticia, su virulencia y capacidad de adaptarse resultan en un gran impacto desde el punto de vista médico, la salud pública y la economía.

Uno de los principales obstáculos para el tratamiento antibiótico de las salmonelosis es la creciente resistencia a los antibióticos, especialmente a los  $\beta$ -lactámicos por producción de  $\beta$ -lactamasas.

La resistencia a los antibióticos implica una ganancia de función que puede implicar un costo biológico, ó disminución del *fitness*, para la bacteria resistente. El término *fitness* describe la capacidad global de un organismo de sobrevivir y reproducirse en un entorno dado.

La hipótesis del presente trabajo plantea que la expresión de determinadas  $\beta$ -lactamasas en *S. Typhimurium* determina una reducción en el *fitness* de dicho microorganismo.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el comportamiento *in vitro* de *S. Typhimurium* expresando  $\beta$ -lactamasas de clase B, C y D, en relación a cepas parentales y ver si se acompañaban de un costo biológico. Para ello se clonaron los genes *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub> en la cepa virulenta *S. Typhimurium* SL1344, tanto en un vector de expresión como en un plásmido natural. Por otro lado se trabajó además con dos aislamientos clínicos de dicho microorganismo que portaban la  $\beta$ -lactamasa de clase C CMY-2.

La expresión de VIM-2, pero no de OXA-66, trajo aparejada alteraciones en la morfología micro y macroscópica, reducciones en la tasa de replicación y la movilidad, y también una menor capacidad de invadir células epiteliales. Estos resultados muestran que la expresión de VIM-2 en *S. Typhimurium* afecta notoriamente el *fitness* de dicho microorganismo, lo que explicaría el bajísimo número de reportes a nivel mundial de *Salmonella* spp. productoras de metalo  $\beta$ -lactamasas.

Otros grupos de trabajo han reportado previamente el costo biológico asociado a la expresión de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC en *Salmonella*. En este sentido, nuestros aislamientos productores de CMY-2 mostraron *fitness* disímiles; mientras que uno presentó menor movilidad y capacidad invasiva, el otro aislamiento tuvo un comportamiento similar al de cepas control y *wild type*. Estas discordancias podrían deberse a la presencia de mutaciones compensatorias que atenúen el costo impuesto por expresar esa  $\beta$ -lactamasa.

## 4. INTRODUCCIÓN

### 4.1 *Salmonella* spp.

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está integrado por serovares patógenos capaces de dar lugar a una variedad de cuadros clínicos en humanos y animales. La gran diseminación de *Salmonella* en el ambiente, su prevalencia en aumento en la cadena alimenticia, su virulencia y capacidad de adaptarse resultan en un gran impacto desde el punto de vista médico, la salud pública y la economía. Se trata de bacilos Gram negativos, no esporulados y anaerobios facultativos. Todos los organismos (a excepción de *Salmonella enterica* serovar Gallinarum-Pullorum) son móviles gracias a flagelos peritricos. Por definición fermentan glucosa pero no lactosa (Pegues *et al.*, 2005). En base a estudios de similitud genómica este género se divide en dos especies, *S. enterica* que contiene seis subespecies (*enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), e *indica* (VI)) y *S. bongori* (Fierer *et al.*, 2001). *S. enterica* subespecie I alberga a casi todos los serotipos patógenos para el hombre, a excepción de enfermedades humanas muy raras producidas por las subespecies IIIa y IIIb. Por otra parte, *S. bongori* y *S. enterica* subespecies II, IIIa, IIIb, IV, y VI se asocian principalmente a vertebrados poiquilotermos (Bäumler *et al.*, 1998).

Los miembros de las seis subespecies de *Salmonella enterica* se dividen en más de 2500 serotipos (serovariedades) en base a los antígenos somático (O), capsular (Vi) y flagelar (H). La nomenclatura de los diferentes serotipos de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* es bastante engorrosa, para simplificar se hará referencia a los mismos en adelante como *Salmonella* seguido de la serovariedad.

Algunos serotipos como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* y *S. Sendai* están muy adaptados a los seres humanos y no tienen otros hospederos conocidos; a su vez otros como *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* presentan un amplio rango de hospederos pudiendo infectar una gran variedad de animales y al hombre. Otros serotipos (como *Dublin* y *Arizonae*) están muy adaptados a hospederos animales y muy ocasionalmente infectan a seres humanos. Las especies del género *Salmonella* representan un complicado pool génico con subgrupos bien marcados que han adquirido grados diferentes de especialización mediante la adquisición (o pérdida) de conjuntos específicos de genes (Anjum *et al.*, 2005) (Fig. 1).

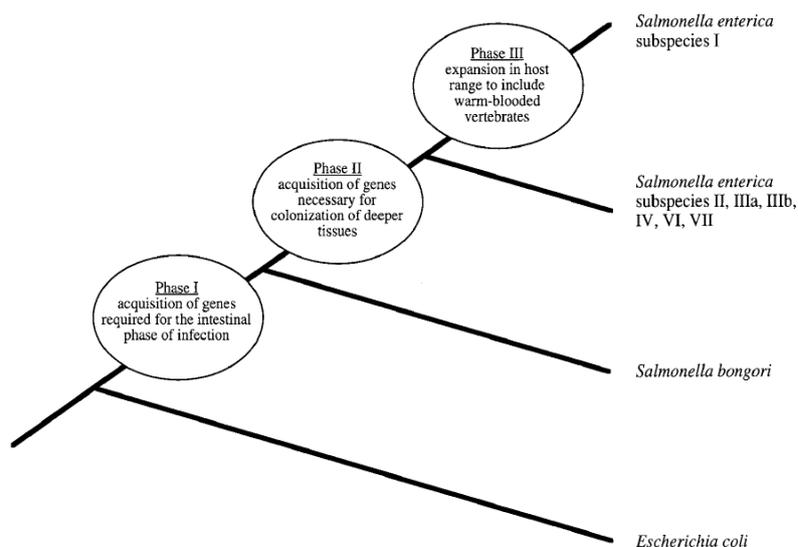


Figura 1. Modelo evolutivo de la adquisición de atributos de virulencia del género *Salmonella*. El árbol filogenético no está diseñado a escala. Imagen tomada de Baumler *et al.*, 1998.

Podemos dividir a los distintos serotipos de *S. enterica* en dos grandes grupos en base al tipo de cuadro que producen: el grupo responsable por la fiebre tifoidea y el grupo *Salmonella* no tifoidea (SNT). La fiebre tifoidea en el humano es una infección sistémica aguda del sistema retículoendotelial y está vinculada clásicamente a *S. Typhi*; otros serotipos como Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Sendai y Cholerasuis, pueden dar lugar a un cuadro clínico similar (Thielman *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2010). Algunos de estos serotipos (*Typhi*, Paratyphi A y C, y Sendai) se encuentran restringidos al hospedador humano, donde causan cuadros sistémicos y rara vez se asocian con gastroenteritis (Tracz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Por otra parte, el segundo grupo presenta un amplio rango de hospedadores, afectando no solo a humanos sino también a aves y ganado bovino, ovino y porcino, constituyendo así un reservorio importante para infecciones en el ser humano (Boyle *et al.*, 2007). El grupo SNT está típicamente vinculado a gastroenteritis y muy ocasionalmente pueden dar lugar a infecciones focales extraintestinales. Eventualmente serotipos de SNT pueden ser responsables de cuadros sistémicos, generalmente en pacientes inmunocomprometidos o en presencia de lesiones que facilitan la colonización (Langridge *et al.*, 2008).

En nuestro país, los serovares del grupo SNT *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* son, en conjunto, la causa más frecuente de intoxicación alimentaria (Betancor *et al.*, 2010). Desde 1971 *S. Typhimurium* ha sido uno de los principales causantes de salmonelosis humana en Uruguay, pasando a ocupar el segundo lugar en frecuencia

detrás de *S. Enteritidis* a partir de 1995. Esta situación epidemiológica es similar a la observada en otros países de América del Sur (Macedo *et al.*, 2008). Del mismo modo, ambos serovares son los principales agentes de salmonelosis a nivel mundial (Bado *et al.*, 2012).

La infección en humanos por *S. Typhimurium* o *S. Enteritidis* permanece por lo general localizada en el intestino y en los ganglios linfáticos mesentéricos, siendo los episodios de bacteriemia raros y transitorios durante las enterocolitis. Sin embargo estos serotipos también pueden dar lugar a infecciones sistémicas en modelos murinos o colonizar de modo asintomático pollos con infección crónica (Fierer *et al.*, 2001).

#### **4.1.1 Patogenia de la infección por *Salmonella* tifoidea.**

La fiebre entérica o tifoidea afecta principalmente a niños y adolescentes en África sub-sahariana, Asia y ciertas regiones de Latinoamérica (Crump and Mintz, 2010). En áreas de alta endemicidad (>100 casos/100.000 personas por año) se transmite por el consumo de agua o alimentos contaminados con heces; en países desarrollados la fiebre entérica es una enfermedad esporádica que ocurre principalmente en viajeros que retornan de zonas de alta/mediana prevalencia. Se estima que ocurren unos 22 millones de nuevos casos anualmente, con 220.000 fallecimientos por esta enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud nuestro continente está en una región de mediana endemicidad con una tasa de 10-100 casos/100.000 personas por año.

Luego de ingeridas, las bacterias atraviesan la mucosa intestinal por las placas de Peyer, se multiplican en el tejido linfóide intestinal y luego se diseminan por vía linfática o hematogena. De este modo *Salmonella* tifoidea se multiplica dentro de células reticuloendoteliales de nódulos linfáticos, bazo, hígado y médula ósea (Thielman *et al.*, 2009). La mayoría de los pacientes presentan un síndrome febril inespecífico sostenido, a menudo de comienzo insidioso, luego de un período de incubación de 7-14 días. Usualmente presentan cefaleas, astenia, mialgia, esplenomegalia y ocasionalmente *rash* cutáneo; otras manifestaciones comunes son episodios repentinos de chuchos solemnes, constipación y bradicardia relativa. En un 10-15% de pacientes con sintomatología prolongada (>2 semanas) pueden aparecer complicaciones como sangrado gastrointestinal, perforación de pared intestinal y encefalopatía tifoidea. Luego de la resolución de la fiebre un 5 a 10% de los pacientes presentan una recaída, con manifestaciones más leves. Más importante aún, entre 1-

5% de los pacientes con fiebre entérica se convierten en portadores asintomáticos a largo plazo, eliminando al germen en heces u orina por un período que puede superar un año de duración (Basnyat *et al.*, 2005). Este fenómeno está dado por la capacidad de *S. Typhi* de colonizar la vesícula biliar del ser humano, usualmente asociado a la presencia de cálculos biliares, evadiendo de este modo al sistema inmune del hospedero (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2011).

#### 4.1.2 Patogenia de la enteritis inducida por *Salmonella* no tifoidea.

Como se mencionó previamente, las distintas variedades de SNT son capaces de dar lugar a una variedad de cuadros. De éstos, la enterocolitis es por lejos la manifestación más frecuente, pero la misma puede verse acompañada de bacteriemia e infecciones focales. El período de incubación típicamente va de seis a 48 horas y es seguido por cefaleas, dolor abdominal, diarrea y vómitos. La infección por los serotipos de SNT da lugar a una diarrea de tipo secretoria mediante la estimulación de la secreción de iones cloruro (Zhang *et al.*, 2003); eventualmente las deposiciones pueden contener también sangre, linfocitos y mucus (Fig. 2).

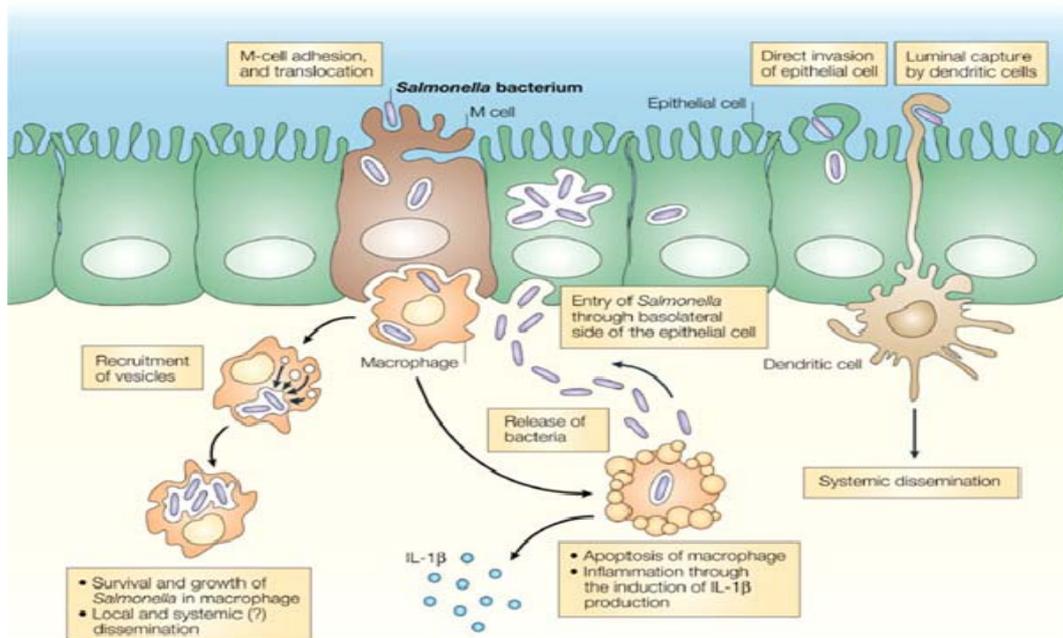


Figura 2. Modelo patogénico de la salmonelosis. Una vez ingeridas, las bacterias deben sobrevivir al pH ácido del estómago y evadir los mecanismos de defensa en el intestino delgado para poder establecerse en el epitelio intestinal. Una vez allí pueden ser traslocadas a través de las células M, ser capturadas por células dendríticas o mediar su propia fagocitosis por los enterocitos. Los serotipos de SNT permanecen allí, dando lugar a una respuesta inflamatoria localizada que resulta en el pasaje de células polimorfonucleares al lumen intestinal con la consiguiente diarrea. Por el contrario los serotipos asociados a procesos sistémicos una vez atravesado el epitelio, invaden los macrófagos intestinales y se diseminan a través del sistema retículoendotelial. Imagen tomada de Sansonetti P, 2004.

Otras manifestaciones como fiebre, astenia y mialgias suelen ser bastante comunes. Los síntomas usualmente se resuelven en una semana, pero la eliminación del germen en las heces puede continuar por un período de hasta 20 semanas en niños y de hasta 8 semanas en adultos. Factores relacionados al hospedero pueden a su vez predisponer a infecciones sistémicas por SNT; entre ellos se encuentran SIDA, anemias hemolíticas y defectos genéticos que afectan la síntesis de IL-12, IFN- $\gamma$ , y la NADPH oxidasa de los fagocitos. De todos modos, aun en el hospedador susceptible ciertos serotipos de *Salmonella* pueden ser más proclives que otros a causar infecciones sistémicas. Estos mismos serotipos son también capaces de dar lugar a infecciones invasivas en personas sin factores predisponentes identificables.

A nivel pediátrico, los neonatos presentan un riesgo mayor de contaminación fecal-oral por *Salmonella* debido a la relativa aclorhidria gástrica y la capacidad de buffer de la leche materna y la leche formulada; aquellas fórmulas enriquecidas en hierro pueden aumentar aún más el riesgo de salmonelosis infantil. Por otra parte, aquellas personas con un elevado pH estomacal, como los pacientes añosos, tienden a ser más susceptibles a contraer salmonelosis (Darwin and Millar, 1999).

La vía de transmisión más frecuente es a través de alimentos o agua contaminada con materia fecal. En humanos, las infecciones por SNT se asocian frecuentemente con productos alimenticios, especialmente aquéllos de origen animal, incluyendo la carne vacuna, carne de pollo y los huevos. Estos últimos pueden contaminarse a través de fisuras en la cáscara o de manera transovárica a partir de un ovario u oviducto infectado previo a la deposición de la cáscara (Guan *et al.*, 2006). A partir de estudios en voluntarios humanos se ha estimado que la dosis infectante oscila entre  $10^5$  y  $10^{10}$  bacterias, pero la cantidad exacta puede variar según el serotipo, el alimento con el que fue consumido el microorganismo y el estado fisiológico del huésped. Se estima que este elevado inóculo es necesario para vencer el ambiente ácido estomacal y para poder competir con la microbiota del tracto intestinal. La dosis infectante tiende a disminuir cuando *Salmonella* es ingerida con alimentos capaces de atravesar rápidamente por el estómago como líquidos o junto con alimentos que neutralizan el pH estomacal como los lácteos (Darwin and Millar, 1999).

Un aspecto notable en la patogenia de *S. Typhimurium* es su capacidad para invadir células no fagocíticas por un proceso que morfológicamente se asemeja a la fagocitosis, siendo las células M de las placas de Peyer el blanco primario para la

invasión celular del epitelio intestinal (Wallis *et al.*, 2000). *Salmonella* se adhiere a la superficie apical del epitelio intestinal e inyecta proteínas efectoras a través del sistema de secreción tipo III (SSTT) hacia el citoplasma de la célula huésped. Las proteínas efectoras, en especial SipA y SipC, modulan la polimerización de actina que resulta en la formación de proyecciones en la superficie apical de la célula epitelial. Este evento tiene lugar tempranamente tanto a nivel de células M como de enterocitos. Además de la remodelación del citoesqueleto, algunas de las proteínas efectoras producidas por *Salmonella* disparan respuestas nucleares que resultan en última instancia en una expresión aumentada de factores quimioattractantes. En respuesta a este estímulo se da un infiltrado de neutrófilos hacia la lámina propia. Una hora post-infección, las bacterias alcanzan la porción basal de la capa epitelial y son fagocitadas por neutrófilos y macrófagos.

En cultivos celulares, *Salmonella* es capaz de inducir la muerte celular de los macrófagos, disparada por la unión de la proteína SipB y la activación de la caspasa; posteriormente, la liberación de interleuquina 1b (IL-1b) induce la liberación de IL-17 por parte de células Th17 y de otros mediadores inflamatorios como IL-22 e IFN- $\gamma$ . A su vez, carbohidratos de la pared bacteriana activan la vía alternativa del complemento estimulando la producción de C5a que, junto al LPS bacteriano, promueven la liberación de IL-8 (Winter *et al.*, 2010). Esta citoquina junto con el quimioattractante hepxilina A3 dirigen la migración de neutrófilos desde los vasos sanguíneos hacia el sitio de infección en el epitelio intestinal. El pasaje de los neutrófilos sumado a efectores como SopB, SopE, SopE2 y SipA dañan las uniones estrechas entre los enterocitos; la infección por *Salmonella* causa además el aumento de la concentración intracelular de inositol (1,4,5,6)-tetrakisfosfato favoreciendo la liberación de Cl<sup>-</sup> a la luz intestinal. El daño al epitelio intestinal sumado a la secreción de iones determina por un lado la pérdida de la superficie absortiva y por otro lado la acumulación de fluidos en el lumen intestinal contribuyendo así a la diarrea (Layton and Galyov, 2007).

Las proteínas efectoras secretadas por estos microorganismos durante la fase intestinal del proceso infeccioso, así como también las proteínas estructurales del SSTT, están codificadas en una región del genoma bacteriano de unos 40kb denominada Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* o SPI-1. Por otra parte, los productos codificados en la isla de patogenicidad 2 (SPI-2) son requeridos para el crecimiento bacteriano dentro de células epiteliales y para la supervivencia dentro de macrófagos; así SPI-2 está involucrada en la modificación del ambiente intracelular una vez que *Salmonella* es internalizada (Haraga *et al.*, 2008)

#### 4.2 Tratamiento de las infecciones por *Salmonella* spp.

El tratamiento antibiótico de las salmonelosis causadas por SNT está indicado solamente para infecciones severas en niños, personas afeadas y pacientes inmunocomprometidos; las recomendaciones terapéuticas suelen ser inhibidores de la vía del folato (trimetoprima-sulfametoxazol), fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación (Guerrant *et al.*, 2001). Uno de los principales obstáculos para el correcto tratamiento de estos casos consiste en la resistencia a los antibióticos por parte de las cepas productoras de enfermedad (Boyle *et al.*, 2007). Dicha resistencia entre los aislamientos humanos de *Salmonella* está en aumento a nivel mundial debido al uso diseminado de agentes antimicrobianos para el tratamiento de síndromes febriles y en la producción agropecuaria (Pegues *et al.*, 2005).

#### 4.3 Resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos es un problema de importancia creciente a nivel mundial. Las bacterias se han valido de varios mecanismos para escapar a la acción letal de estas drogas: i) Acumulación intracelular disminuida mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana externa, ya sea por reducción en el número de porinas o mediante eflujo activo; ii) Alteración del sitio blanco mediante modificación enzimática o por mutaciones; iii) Inactivación enzimática del antibiótico; iv) Protección del sitio blanco; v) Sobreproducción del blanco y vi) *Bypass* del blanco del antimicrobiano (Tabla 1). La coexistencia de varios de estos mecanismos en un mismo hospedero lleva a la aparición de microorganismos multirresistentes (Moellering *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos de variabilidad genética bacteriana pueden determinar la adquisición de resistencia a antibióticos.

En primer lugar, se encuentran mutaciones puntuales (cambios microevolutivos), las cuales pueden alterar el sitio blanco de un determinado antibiótico, interfiriendo así con su actividad. Por ejemplo, mutaciones puntuales en enzimas que inactivan un determinado antibiótico, pueden ampliar el espectro de resistencia conferido la misma; es así que en nuestro país se ha reportado la presencia de la enzima TEM-144 que deriva de su antecesor TEM-1 por dos mutaciones puntuales que le confieren la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación (Vignoli *et al.*, 2006).

Los cambios macroevolutivos son los que resultan de reordenamientos de grandes segmentos de ADN en un único evento. Éstos incluyen inversiones, duplicaciones, inserciones, deleciones o transposición de secuencias largas de ADN desde un locus del cromosoma bacteriano a otro. Estos eventos a menudo están mediados por

elementos genéticos especializados como transposones, los cuales poseen la habilidad de “saltar” de un lugar a otro del genoma bacteriano.

Tabla 1. Mecanismos de resistencia según la familia de antibiótico

| Mecanismo                   | $\beta$ -lac | AG    | Clf   | Mac    | Sul | Tet   | Trm   | Qnl   | Glp    | L, Ss | Rif |
|-----------------------------|--------------|-------|-------|--------|-----|-------|-------|-------|--------|-------|-----|
| Inactivación enzimática     | +++          | +++   | +++   | +(GN)  | -   | -     | -     | +     | -      | -     | -   |
| Permeabilidad disminuida    | +(GN)        | +(GN) | +(GN) | ++(GN) | -   | +(GN) | +(GN) | +(GN) | ++(GN) | +(GN) | -   |
| Eflujo                      | +            | +     | +     | ++     | -   | +++   | -     | +     | -      | -     | -   |
| Alteración del sitio blanco | ++           | ++    | -     | +++    | ++  | +     | +++   | +++   | +++    | +++   | +++ |
| Protección del sitio blanco | -            | -     | -     | -      | -   | ++    | -     | +     | -      | -     | -   |
| Sobreproducción del blanco  | +(Ef)        | -     | -     | -      | ++  | -     | ++    | -     | +      | -     | -   |
| Bypass de vía metabólica    | -            | -     | -     | -      | +   | -     | +     | -     | -      | -     | -   |

$\beta$ -lac:  $\beta$ -lactámicos; AG: aminoglucósidos; Clf: cloranfenicol; Mac: Macrólidos; Sul: sulfonamidas; Tet: tetraciclinas; Trm: trimetoprima; Qnl: quinolonas; Glp: glucopéptidos; L,Ss: lincosamidas y estreptograminas; Rif: rifampicina. +++, mecanismo más común; ++, común; +, poco común; -, ausente; GN: Gram negativos; Ef: *Enterococcus faecium*.

Un tercer nivel de variabilidad genética está dado por los mecanismos de transferencia horizontal entre bacterias (conjugación, transducción, islas genómicas y transforamción) que hacen posible la adquisición de ADN exógeno. Dichos eventos están mediados por plásmidos, bacteriófagos y, *cassettes* genéticos.

En resumen, la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos puede darse a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia mediada por plásmidos o transposones, por recombinación de ADN exógeno con el cromosoma bacteriano, o mediante mutaciones en distintos *loci* cromosómicos.

Cuando un gen de resistencia a antibióticos evoluciona, este determinante de resistencia puede diseminarse entre las bacterias mediante transformación, transducción, o conjugación. Las clonas seleccionadas pueden proliferar en la flora de aquellos pacientes bajo tratamiento con antimicrobianos (Opal and Medeiros, 2005).

#### 4.4 Costo biológico de la resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos implica una ganancia de función que puede aparejar un costo biológico o disminución del *fitness* para la bacteria hospedadora (Depardieu *et al.*, 2007). El término *fitness* describe la capacidad global de un

organismo de sobrevivir y reproducirse en un entorno dado y el mismo puede evaluarse mediante el cálculo de las tasas de crecimiento (Durso *et al.*, 2004). Así, el *fitness* de un patógeno resistente a antibióticos podría determinarse comparando las tasas relativas a las cuales la bacteria resistente y la bacteria sensible a) crecen y mueren en su hospedero y en el ambiente, b) se diseminan entre diferentes hospederos y c) son eliminadas de los huéspedes infectados (Martínez and Baquero, 2000).

La relevancia de los estudios de costo biológico estriba en que la completa erradicación de los determinantes de resistencia una vez presentes en poblaciones bacterianas, mediante la remoción de la presión de selección ejercida por el/los antibióticos, no parece ser tan sencilla como aparenta. En presencia de un antibiótico determinado, el parámetro biológico más importante responsable de la tasa de crecimiento y la frecuencia en la aparición de las bacterias resistentes dentro de una población, es el costo que los genes de resistencia y los elementos accesorios imponen en el *fitness* bacteriano.

A nivel médico, el estudio del costo biológico de la resistencia es importante para poder predecir el desarrollo de dicha resistencia y determinar la posible persistencia en el ambiente de clones resistentes a antibióticos en ausencia de presión de selección. De esta manera se podrían evaluar políticas de intervención tendientes a modificar los perfiles de resistencia en las poblaciones microbianas circulantes.

Otra motivación surge desde el desarrollo de nuevas drogas. Si bien las tasas de mutación influyen en el desarrollo de resistencia, el costo biológico de la misma puede ser un mejor predictor del riesgo de aparición y estabilidad, o reversibilidad de dicha resistencia. De este modo, una estrategia más racional para el desarrollo de nuevos fármacos sería identificar aquellos blancos para los cuales los mecanismos de resistencia tienen los efectos más negativos en el *fitness* bacteriano.

Entonces, la implementación de estrategias racionales destinadas a minimizar el desarrollo de resistencia precisa del conocimiento de los mecanismos de dicha resistencia, la frecuencia con la cual aparecen las variantes resistentes y del entendimiento de cómo la resistencia a los antibióticos afecta el ciclo de vida de las bacterias (crecimiento, supervivencia dentro y fuera del hospedero, tasas de transmisión y factores de virulencia).

#### **4.4.1 Costo biológico de la resistencia mediada por ADN cromosómico.**

El mismo se asocia a mutaciones en genes que determinan la modificación de la/s molécula/s blanco; éstas habitualmente son responsables de funciones celulares

esenciales, por lo tanto es esperable que tales mutaciones acarreen un costo biológico y afecten la tasa de crecimiento bacteriano. En este sentido, la mayoría de los estudios sobre el costo biológico de la resistencia debido a cambios en el sitio blanco muestran algún grado de disminución en el *fitness* (Björkman and Andersson, 2000). A modo de ejemplo, Giraud y cols. (Giraud *et al.*, 2003) encontraron que la resistencia de alto nivel a las fluoroquinolonas en *S. Typhimurium*, provocada por mutaciones en las girasas, se veía acompañada de alteraciones fisiológicas importantes como tasas de crecimiento reducidas, además de alteraciones en la morfología macro y microscópica (Fig. 3).

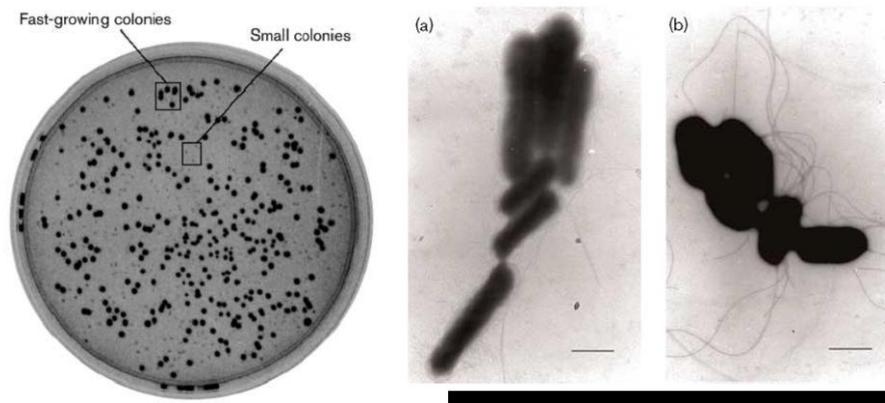


Figura 3. A la izquierda se muestra las alteraciones macroscópicas observadas en *S. Typhimurium* con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (colonias pequeñas) en comparación a la cepa *wild type* (colonias grandes). A la derecha se muestran micrografías electrónicas de la cepa parental (a) y la cepa mutante resistente a ciprofloxacina (b). La barra representa 1  $\mu$ m. Imagen tomada de Giraud *et al.*, 2003.

#### 4.4.2 Costo biológico de la resistencia mediada por ADN extracromosómico.

La resistencia mediada por plásmidos, fagos y transposones generalmente implica la introducción de genes que codifican para enzimas que inactivan antibióticos o para bombas de eflujo que extraen al fármaco fuera del citoplasma bacteriano. En presencia de antibióticos cualquier costo biológico asociado a plásmidos de resistencia se ve compensado por la ventaja selectiva que dicho plásmido confiere a la célula hospedadora. Por otra parte, en ausencia de la presión de selección ejercida por los antibióticos, el costo biológico impuesto por tales plásmidos estaría vinculado a la propia función de resistencia o al mantenimiento del mismo (costos de replicación del plásmido y síntesis de las proteínas codificadas en el plásmido, entre otros). Usualmente la presencia de transposones no implica una carga metabólica para su hospedero en virtud de su pequeño tamaño y de que usualmente se insertan como unicopia en el cromosoma bacteriano (Enne *et al.*, 2005).

#### 4.5 Atenuación del costo biológico impuesto por la resistencia.

En ausencia de antibióticos el costo biológico asociado a mecanismos de resistencia es la principal causa de la pérdida de estos determinantes. La atenuación del costo biológico impuesto por dicha resistencia puede darse por varios mecanismos:

(1) Una mutación en genes esenciales (p.ej. girasas o polimerasas), en ausencia de presión selectiva por antibióticos, podría no ser seleccionada por su desventaja competitiva), revertir a su estado ancestral (mutaciones intragénicas) o ser compensada mediante mutaciones adicionales en otros *loci* cromosómicos (mutaciones intergénicas) (Fig. 4). Dado que estas mutaciones pueden darse en múltiples genes, la frecuencia de mutaciones compensatorias es más elevada que la de reversión (tanto a nivel plasmídico como cromosómico) (Zhang *et al.*, 2005).

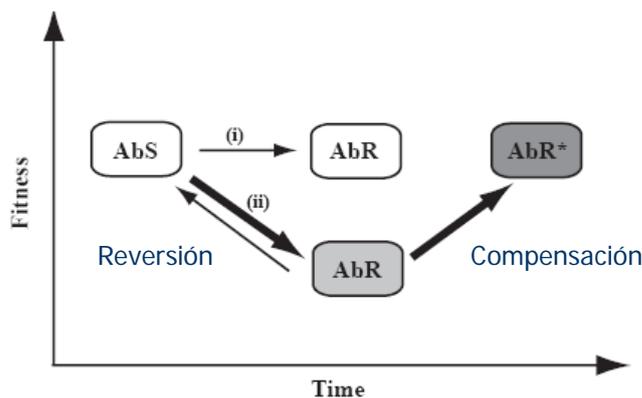


Figura 4. Estrategias seguidas por una población bacteriana determinada frente a la disminución del *fitness* ocasionada por la ganancia de resistencia a antibióticos. AbS: población *wild type* sensible a los antibióticos; AbR: población resistente a antibióticos; AbR<sup>+</sup>: Restauración del *fitness* producto de mecanismos compensatorios. Imagen tomada de Björkman and Andersson, 2000.

En este sentido, Maisnier-Patin y cols. demostraron que *S. Typhimurium* puede compensar el costo biológico de la resistencia a estreptomicina causada por mutaciones ribosomales restrictivas. La estreptomicina es un antibiótico perteneciente a la familia de los aminoglucósidos y actúa inhibiendo el paso de elongación de la traducción durante la síntesis proteica. Mutaciones en el gen *rpsL* (que codifica para la proteína S12) y el ARNr 16S confieren altos niveles de resistencia a dicho antibiótico. Las mutaciones en la proteína S12 afectarían el equilibrio entre los dos estados de la subunidad 30S ribosomal, un estado propenso a errores (*ram*, ribosomal ambiguity) y un estado restrictivo (mayor fidelidad en la traducción). Las mutaciones compensatorias desplazarían el equilibrio nuevamente hacia el estado normal (estado *ram*), con restauración del *fitness* bacteriano (Maisnier-Patin *et al.*, 2002).

(2) Otro mecanismo compensatorio sería mediante la hiperproducción de una enzima defectuosa compensando así la pérdida de función de la misma (Maisnier-Patin and

Andersson, 2004). Del mismo modo, las bacterias podrían atenuar el costo biológico impuesto por la resistencia a antibióticos silenciando los genes de resistencia (no esenciales) cuando no se requiere de su funcionamiento (Enne *et al.*, 2006).

(3) La reducción del costo biológico asociado a la presencia de plásmidos puede darse mediante dos procesos: segregación y/o mutaciones compensatorias. La segregación resulta en la pérdida del plásmido y por ende del fenotipo resistente, mientras que las mutaciones compensatorias pueden o no anular la resistencia (Dahlberg and Chao, 2003).

#### 4.6 Resistencia a los $\beta$ -lactámicos.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluidos penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético, que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico (Fig. 5). Dentro de esta familia, los carbapenems poseen el espectro más amplio de acción y mayor potencia contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

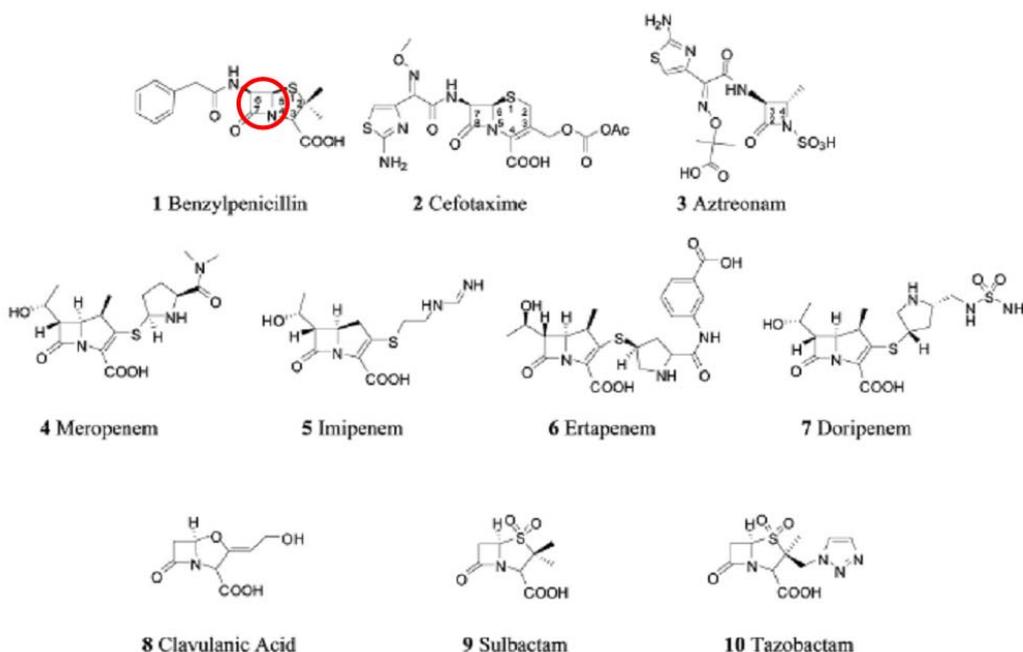


Figura 5. Estructura química de los distintos representantes de la familia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Dentro del círculo rojo se señala el anillo  $\beta$ -lactámico. Se indica además del nombre de cada compuesto el grupo al cual pertenece: 1) Penicilinas; 2) Cefalosporinas; 3) Monobactámicos; 4-7) Carbapenems; 8-10) Inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Imagen adaptada de Drawz and Bonomo, 2010.

Los  $\beta$ -lactámicos son agentes bactericidas que actúan inhibiendo la última etapa en la síntesis de la pared bacteriana, inactivando irreversiblemente las transpeptidasas del peptidoglicano debido a la analogía estructural existente entre la

terminación peptidil D-alanil-D-alanina de éste y el anillo  $\beta$ -lactámico (Rice and Bonomo, 2011). Las transpeptidasas, pertenecientes a la familia de proteínas de unión a la penicilina (penicillin binding proteins o PBPs), catalizan el entrecruzamiento de los polímeros de peptidoglicano en la pared celular de la bacteria, por lo que la inhibición de este paso resulta en la muerte celular (Zervosen *et al.*, 2012).

Como se indicó en la tabla 1, los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en bacilos Gram negativos son la modificación del sitio blanco y la inactivación enzimática del fármaco.

#### **4.6.1. Modificación de las PBPs.**

La resistencia mediada por PBPs puede darse de varias maneras: i) sobreproducción de las mismas, como es el caso de la PBP5 por parte de *Enterococcus faecium* (Fontana *et al.*, 1994), ii) adquisición de PBPs exógenas de baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, por ejemplo la PBP2a en el caso de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (Chambers, 1997) iii) recombinación de una PBP sensible con variantes más resistentes, ejemplificado por microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae*, entre otros (Hakenbeck and Coyette, 1998) y iv) mutaciones puntuales dentro de la PBP con disminución de la afinidad por los  $\beta$ -lactámicos, también dentro del género *Enterococcus* (Rybkin *et al.*, 1998).

#### **4.6.2 Producción de $\beta$ -lactamasas.**

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas globulares pertenecientes a la superfamilia de las serín-proteasas o D,D-peptidasas, que habrían evolucionado a partir de enzimas encargadas de las síntesis de la pared celular (Massova and Mobashery, 1998). Estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico y constituyen la principal causa de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos entre las bacterias Gram negativas (Bush K, 2010); al presente se han descrito unas 1.000 variantes de estas enzimas (Davies and Davies, 2010). Estas enzimas habrían evolucionado a partir de proteínas de unión a penicilina (PBPs) (Rasmussen and Hoiby, 2006) y se encuentran mayoritariamente codificadas en plásmidos, lo que determina su fácil diseminación entre distintos aislamientos (Bradford P, 2001). Si bien estas enzimas son excretadas al medio extracelular por parte de los microorganismos Gram positivos, las  $\beta$ -lactamasas sintetizadas por gérmenes Gram negativos permanecen dentro del espacio periplásmico (Livermore D, 1995).

La mayoría de estas enzimas actúan a través de la formación de un complejo acil-penicilina que se hidroliza rápidamente, regenerando la enzima (Matagne *et al.*, 1998) (Fig. 6). Por otra parte, existe también un grupo de enzimas dependientes de zinc que actúan a través de un mecanismo diferente (Rasmussen and Bush, 1997).

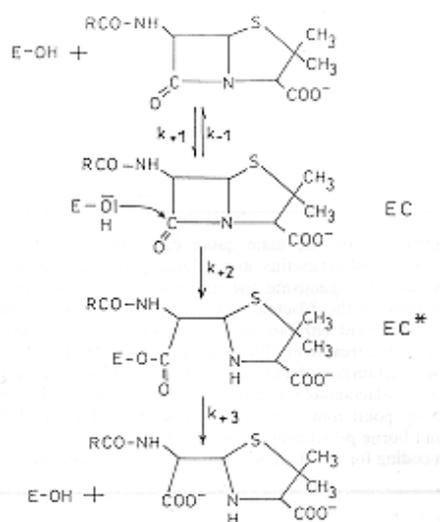


Figura 6. Mecanismo de acción de las serín β-lactamasas de los grupos A, C y D. En una primera instancia la enzima forma una unión no covalente con el antibiótico dando lugar a un complejo de Michaelis no covalente. El anillo β-lactámico sufre luego un ataque nucleofílico por un grupo hidroxilo libre en la cadena lateral del residuo de serina en el sitio activo de la enzima, formándose un complejo acil-éster covalente. La hidrólisis del enlace ester libera finalmente a la enzima activa y a un derivado inactivo del antibiótico. Imagen tomada de Matagne *et al.*, 1998.

Las β-lactamasas pueden clasificarse, según el esquema propuesto por Ambler, en cuatro grupos distintos: A, B, C y D en función de la identidad de su secuencia aminoacídica (Ambler, and Scott, 1980), o siguiendo una clasificación funcional basada en punto isoeléctrico, perfil hidrolítico, agentes inhibitorios y clase molecular (Bush, *et al.*, 1995). Las enzimas de clase A, cuyo prototipo es la enzima TEM-1, están codificadas en plásmidos y su peso molecular oscila entre 25 y 30 KDa al igual que las de clase B y D. Las enzimas de clase C están generalmente codificadas en el cromosoma bacteriano y son típicamente inducibles por β-lactámicos. Se trata de proteínas que presentan unos 100 aminoácidos más que las de los otros grupos, por lo que su peso molecular suele rondar los 40 KDa o más. En algunas especies, la región reguladora del gen ha desaparecido y en consecuencia la enzima se expresa constitutivamente. Las enzimas de clase B requieren zinc para su actividad y son consideradas por ello metalo-β-lactamasas. En general son plasmídicas, inhibibles por EDTA, incluyéndose aquí las enzimas que confieren resistencia a los carbapenems. Las enzimas de clase D constituyen un grupo de enzimas plasmídicas, con actividad incrementada sobre oxacilina (OXA-1), inhibibles por iones cloruro y de forma variable por inhibidores del tipo ácido clavulánico o Sulbactam. Estas enzimas al igual que lo observado en las enzimas de clase A, han ampliado su espectro de acción mediante mutaciones puntuales a partir de enzimas con actividad reducida a penicilinas. De este modo podemos dividir a las distintas variantes de OXA en función

de su perfil hidrolítico: i) de espectro reducido; ii) oxacilinasas de espectro expandido; iii) carbapenemasas; e iv) indeterminado (Poirel *et al.*, 2010).

Las enzimas agrupadas dentro de la clase B presentan un mecanismo de acción diferente al de las serín proteasas ya que en este caso no se producen uniones covalentes entre la enzima y el sustrato. Estas enzimas poseen una estructura de tipo  $\alpha\beta\alpha$  con un sándwich  $\beta$  central y dos  $\alpha$ -hélices a los lados y requieren de zinc u otro metal pesado para la catálisis (Walsh *et al.*, 2005). Las  $\beta$ -lactamasas de clase B pueden dividirse en tres subclases distintas (B1, B2 y B3) en función de los requerimientos de zinc. Las enzimas B1 (VIM-2 e IMP-1, entre otras) funcionan con uno o dos iones  $Zn^{2+}$ ; las enzimas B3 requieren de dos iones  $Zn^{2+}$  y aquellas de clase B2 pierden actividad al agregarse un segundo ion  $Zn^{2+}$  (Galleni *et al.*, 2001; Rasmussen and Bush, 1997). Entonces, cada átomo de  $Zn^{2+}$  actúa polarizando distintas estructuras del anillo  $\beta$ -lactámico; así, el residuo  $Zn^{2+}(1)$  actúa polarizando el grupo carbonilo de dicho anillo, produciendo un hueco oxianiónico que favorece la hidrólisis. El residuo  $Zn^{2+}(2)$  queda dispuesto próximo al grupo N del anillo  $\beta$ -lactámico, lo que sugiere que interactuaría con el grupo amida de modo de estabilizar el sustrato durante el ataque nucleofílico y favorecer luego el recambio de sustrato de la enzima (Wang *et al.*, 1999). La utilización de EDTA (quelante de cationes divalentes) sustrae el  $Zn^{2+}$  del sitio activo, generando así la inactivación de estas enzimas (Walsh *et al.*, 2005). El perfil hidrolítico de las metalo- $\beta$ -lactamasas de los subgrupos B1 y B3 incluye la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (incluidos los carbapenems), a excepción de los monobactámicos. Por otro lado, las enzimas pertenecientes a la subclase B2 son estrictamente carbapenemasas, mostrando muy débil actividad frente a las penicilinas y cefalosporinas (Bebrone C, 2007).

#### 4.7 Mecanismos de resistencia a $\beta$ -lactámicos en *Salmonella* spp.

Un hecho llamativo es que la gran mayoría de los aislamientos clínicos de *Salmonella* productores de  $\beta$ -lactamasas sintetizan enzimas de clase A (Arlet *et al.*, 2006). En este sentido, a nivel mundial se han descrito múltiples aislamientos de *Salmonella* spp productoras de variantes de enzimas tipo TEM (Vignoli *et al.*, 2006), SHV (González-Sanz *et al.*, 2009), CTX-M y PER (Bado *et al.* 2012; Gutkind *et al.*, 2013), e incluso KPC (Miriagou *et al.*, 2003). Otro de los aspectos salientes del género *Salmonella* es la ausencia en su cromosoma del gen *ampC* (que codifica para una  $\beta$ -lactamasa de clase C) en contraste con otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* con los que probablemente comparten el mismo ancestro, tal

como *Escherichia* o microorganismos relacionados como *Citrobacter* o *Enterobacter* (Hossain *et al.*, 2004; Morosini *et al.*, 2000). Sin embargo, se han descrito cepas de *Salmonella* spp. portando  $\beta$ -lactamasas de clase C plasmídicas en África, Asia, Europa, Norte, Centro y Sudamérica (Philippon *et al.*, 2002). De las distintas variantes de AmpC plasmídicas, CMY-2 es la más diseminada a nivel mundial, aunque se han aislado cepas de *Salmonella* produciendo otras variantes como CMY-4, CMY-7, ACC-1 y DHA-1, no existiendo una asociación estadística entre el tipo de enzima y el serotipo (Jacoby GA, 2009).

Por otra parte, también se ha reportado, aunque con menor frecuencia, la existencia de aislamientos de *Salmonella* productores de  $\beta$ -lactamasas de clase D (OXA). Curiosamente, a pesar de que se han reportado más de 300 variantes de estas enzimas (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>), solo cuatro de dichas variantes han sido encontradas en *Salmonella* spp.; en este sentido, OXA-1 y OXA-2 están presentes en distintos serotipos, mientras que OXA-53 ha sido detectada únicamente en un aislamiento de *Salmonella* Agona (Mulvey *et al.*, 2004) y OXA-129 en un aislamiento de *Salmonella* Bredeney (Michael *et al.*, 2008).

Si bien ya se había descrito en nuestro país la presencia de cepas de *Salmonella* productoras de  $\beta$ -lactamasas de clase A, los dos primeros aislamientos productores de AmpC (clase C) plasmídica fueron obtenidos recién en los años 2009 y 2010. De manera similar, a pesar de haberse detectado la presencia de *S. Typhimurium* productoras de  $\beta$ -lactamasas de clase D en el Uruguay (Vignoli R, comunicación personal), dichas enzimas no han sido aún plenamente caracterizadas.

Finalmente, la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas (clase B) en *Salmonella* es un hecho sumamente infrecuente, tanto así que hasta la fecha se han descrito únicamente dos casos a nivel mundial y ambos en los últimos años. El primero se obtuvo de un hisopado rectal de un paciente internado en una unidad de cuidados intensivos en EE.UU. luego de haber estado hospitalizado en India; la cepa fue identificada como *Salmonella* Seftenberg y la metalo- $\beta$ -lactamasa como NDM (Savard *et al.*, 2011). El segundo reporte corresponde a un paciente internado en la Isla Reunión, luego de haber estado internado en la India; en este caso se aisló *Salmonella* Westhampton a partir de orina y la metalo- $\beta$ -lactamasa identificada también fue NDM (Cabanés *et al.*, 2012).

## 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En función de lo mencionado anteriormente, en la presente Tesis nos planteamos como hipótesis general que la síntesis de  $\beta$ -lactamasas de clases B o D por parte de *Salmonella* Typhimurium determina un costo biológico para dicho microorganismo.

En este contexto, el objetivo general de este proyecto es estudiar el comportamiento *in vitro* de *S. Typhimurium* SL1344 expresando  $\beta$ -lactamasas de clase B o D (parte I).

Por otra parte, durante el transcurso de la etapa experimental de este trabajo, recibimos en el Dpto. de Bacteriología y Virología (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina) los primeros aislamientos clínicos en nuestro país de *Salmonella* productores de enzimas de tipo AmpC. En función de la importancia de tales aislamientos y por estar relacionados con la temática de esta tesis, fueron incluidos en la misma (parte II).

Entonces, se tienen como objetivos específicos:

- a) La elaboración de construcciones genéticas portadoras de genes *bla* codificantes para  $\beta$ -lactamasas de clase B o D y la transformación de *Salmonella* Typhimurium SL1344 con las mismas.
- b) Determinar si existe o no una alteración del *fitness* de *S. Typhimurium* SL1344 asociado a la expresión de  $\beta$ -lactamasas de clases B o D, comparando parámetros como la tasa de crecimiento, movilidad e invasividad, en relación a la cepa parental.
- c) Caracterizar los dos aislamientos de *S. Typhimurium* productores de enzimas de tipo AmpC previamente mencionados y estudiar si la producción de dichas enzimas se acompaña de una reducción en el *fitness* de los mismos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**PARTE I****6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.**

Las características salientes de las cepas y los plásmidos usados en este trabajo se detallan en la tabla 2; las cepas resultantes con las cuales se llevaron a cabo los ensayos *in vitro* se describen en la tabla 3. Todas las cepas se cultivaron a 37°C y aerobiosis en caldo LB (Luria Bertani) suplementado con ampicilina o kanamicina a una concentración final de 100µg/ml o 25µg/ml, respectivamente, cuando se requirió.

Tabla 2. Cepas y plásmidos usados

| Cepa/plásmidos   | Genotipo/Fenotipo  | Origen/referencias            |
|--|--|-------------------------------|
| <b>Cepas bacterianas</b>   |  |                               |
| <i>E. coli</i> DH5α  | F <sup>-</sup> <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), λ <sup>-</sup>                                | Hanahan D, 1985.              |
| <i>E. coli</i> MC1061  | F <sup>-</sup> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 [ <i>araD139</i> ] <sub>B/r</sub> Δ( <i>codB-lacI</i> )3 <i>galK16 galE15</i> λ <sup>-</sup> e14 <sup>-</sup> <i>mcrA0 relA1 rpsL150</i> (strR) <i>spoT1 mcrB1 hsdR2</i> (r <sup>-</sup> m <sup>+</sup> ) | Casdaban and Cohen, 1980.     |
| <i>E. coli</i> K12 J53-2   | F <sup>-</sup> <i>pro met</i> Rif <sup>R</sup>   | Smith <i>et al.</i> , 1975.   |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium str. SL1344 | <i>xyl hisG rpsL</i> ; virulenta; Sm <sup>R</sup> , derivado de un aislamiento clínico animal.   | Hoiseith and Stocker, 1981.   |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium str. SL5338 | <i>galE</i> (r-m <sup>+</sup> )  | Bullas and Ryu, 1983.         |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Aislamiento clínico obtenido de un lavado broncoalveolar; <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> .  | Toleman <i>et al.</i> , 2007. |
| <i>A. calcoaceticus-baumannii</i> complex 39AT                         | Aislamiento clínico obtenido de un aspirado traqueal; <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> .   | Vignoli and Seija, 2004.      |
| <b>Plásmidos</b>   |  |                               |
| pBAD22   | Vector de expresión, inducible con L-arabinosa, Amp <sup>R</sup> .   | Guzman <i>et al.</i> , 1995.  |
| pLV1   | pBAD22 conteniendo el gen <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> bajo control del promotor P <sub>BAD</sub> , Amp <sup>R</sup>  | El presente trabajo.          |
| pLO5   | pBAD22 conteniendo el gen <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> bajo control del promotor P <sub>BAD</sub> , Amp <sup>R</sup>   | El presente trabajo.          |
| pST12  | Plásmido natural obtenido de <i>Salmonella</i> Derby conteniendo el gen <i>bla</i> <sub>TEM-144</sub> , bajo control del promotor P <sub>3</sub> , Amp <sup>R</sup> .  | Vignoli <i>et al.</i> , 2006. |
| pSTVIM   | pST12 conteniendo el gen <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> bajo control del promotor P <sub>3</sub> , Amp <sup>R</sup> .   | El presente trabajo.          |
| pKD4   | Vector conteniendo el gen <i>aph</i> (3') (amino O-fosfotransferasa), Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .  | Datsenko and Wanner, 2000.    |
| pBAD22::kan  | pBAD22, <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> :: <i>aph</i> (3'), Kan <sup>R</sup> .   | El presente trabajo.          |
| pLO5::kan  | Plásmido pLO5 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> :: <i>aph</i> (3'), Amp <sup>R</sup> (inducible), Kan <sup>R</sup> .   | El presente trabajo.          |
| pLV1::kan  | Plásmido pLV1 <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> :: <i>aph</i> (3'), Amp <sup>R</sup> (inducible), Kan <sup>R</sup> .   | El presente trabajo.          |

Tabla 3. Nomenclatura de las cepas resultantes

| Cepa  | Características relevantes                         | Origen/referencias  |
|-------|--|---------------------|
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el vector   |                     |
| LVR41 | pBAD22   | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR42 | pLO5   | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR43 | pLV1   | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR44 | pBAD22::kan  | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR45 | pLO5::kan  | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR46 | pLV1::kan  | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR47 | pST12  | El presente trabajo |
|       | S. Typhimurium SL1344 transformada con el plásmido |                     |
| LVR48 | pSTVIM   | El presente trabajo |

Los genes *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> fueron elegidos de manera arbitraria y en función de la facilidad de poder acceder a los mismos. El primero se encuentra naturalmente presente en *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, disponiéndose en el cepario del Dpto. de Bacteriología y Virología de una extensa colección de dicho microorganismo. La cepa *Pseudomonas aeruginosa* portadora de *bla*<sub>VIM-2</sub> fue amablemente cedida por el Dr. Juan A. Ayala, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, en el transcurso de una instancia docente que realizó en nuestro país.

## 6.2 Obtención de ADN genómico.

Se obtuvo ADN genómico a partir de las cepas *P. aeruginosa bla*<sub>VIM-2</sub><sup>+</sup> y *A. calcoaceticus/baumannii* complex (*A. baumannii bla*<sub>OXA-66</sub><sup>+</sup>) empleando el *kit* comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen ®). Para ello se centrifugó 1.5 ml de un cultivo *overnight* (ON) en caldo LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (amp) de cada cepa, a 7500 RPM durante 10 minutos. Luego de descartar el sobrenadante se procesaron los sedimentos bacterianos siguiendo las instrucciones del fabricante. Al ADN se conservó a -20°C hasta su uso. Alternativamente se obtuvo ADN genómico mediante la técnica de shock térmico; brevemente, se resuspendieron 1-2 colonias de

cada cepa en 150  $\mu$ l de agua ultrapura, posteriormente las suspensiones fueron calentadas a 100°C durante 10 minutos y luego enfriadas por igual periodo a 0°C; las suspensiones fueron luego centrifugadas a máxima velocidad (13.000 RPM) y el sobrenadante fue transferido a tubos de minicentrífuga nuevos y almacenado a -20°C.

### 6.3 Construcción de las cepas productoras de VIM-2 y OXA-66 inducibles.

Para la construcción de las cepas de *Salmonella* Typhimurium que expresan de manera inducible las  $\beta$ -lactamasas VIM-2 y OXA-66, se empleó el vector de expresión pBAD22 (Fig. 7).

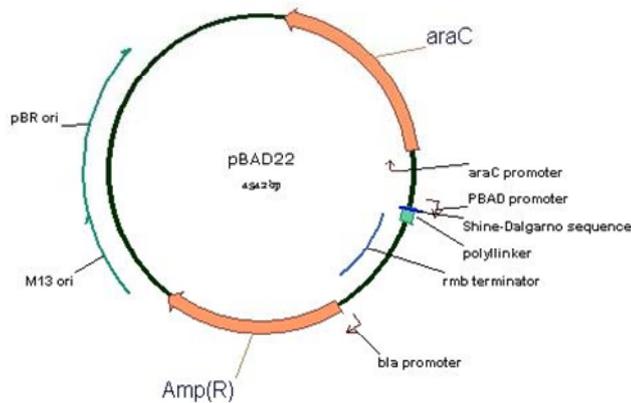


Figura 7. Vector de expresión pBAD22 (4542pb). *araC*: regulador del promotor  $P_{BAD}$ ; Amp(R): gen de resistencia a ampicilina ( $bla_{TEM-1}$ ); *rmb*: terminador de la transcripción perteneciente al operón *rmb*. M13: origen de replicación del fago M13; pBR: origen de replicación del vector pBR322.

El mismo contiene el promotor  $P_{BAD}$  del operón arabinosa y su gen regulatorio *araC*. La proteína AraC es a la vez un regulador positivo y negativo. En presencia de arabinosa, se activa la transcripción a partir del promotor  $P_{BAD}$ , mientras que en ausencia de arabinosa la transcripción se reduce al mínimo (Bustos and Schleif., 1993). Los niveles de transcripción pueden reducirse aún más mediante la presencia de glucosa (Guzman *et al.*, 1995). Por otro lado, la presencia en este vector del origen de replicación del plásmido pBR322 resulta en un número intermedio de copias (unas 20/cél. aproximadamente).

El gen  $bla_{VIM-2}$  se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico purificado de un aislamiento de *P. aeruginosa* conteniendo dicho gen. Los cebadores *vimF* y *vimR*, se construyeron en base a secuencias depositadas en Genbank conteniendo sitios de restricción en cada extremo (*EcoRI* y *HindIII*, respectivamente). De manera similar el gen  $bla_{OXA-66}$  se obtuvo a partir de un aislamiento clínico de *A. baumannii*. Los cebadores para este gen, *oxaF* y *oxaR*, se diseñaron siguiendo la estrategia descrita anteriormente, con sitios de corte para *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente (Tabla 4).

La mezcla de PCR se hizo de modo tal que la concentración final de los reactivos fue la siguiente:  $[MgCl_2]_f=2.5mM$ ,  $[dNTPs]_f=0.2mM$ ,  $[Cebadores]_f=0.3\mu M$  c/u. La

amplificación se llevó a cabo usando una mezcla de polimerasas Taq:Pfu en una proporción 10U:1U, y las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 94°C durante 30 seg, 53°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto. El resultado de la PCR ( $bla_{VIM-2}$ =820pb y  $bla_{OXA-66}$ =850pb) se visualizó mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TBE 0,5X y posterior tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Sample & Assay Technologies). Posteriormente, fueron sometidos a un ensayo de doble restricción (*EcoRI/HindIII* y *EcoRI/XbaI* para  $bla_{VIM-2}$  y  $bla_{OXA-66}$ , respectivamente), incubando las mezclas de reacción durante 3 horas y siguiendo las indicaciones del fabricante (Fermentas, Life Sciences); el ADN fue posteriormente precipitado mediante Acetato de Sodio-Etanol.

Paralelamente el vector pBAD22 fue sometido a sendos ensayos de doble restricción con las enzimas mencionadas anteriormente. Se comprobó la linealización del vector en cada ensayo de doble restricción mediante electroforesis en agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TBE 0.5X y tinción con bromuro de etidio. La concentración de ADN de los amplicones purificados y los vectores linealizados se determinó mediante lectura de absorbancia (A<sub>260/280nm</sub>) en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). Los productos de amplificación se clonaron en el vector pBAD22 generando los plásmidos pLV1 y pLO5 (pBAD22 portando  $bla_{VIM-2}$  y  $bla_{OXA-66}$ , respectivamente). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo usando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen, Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante con una proporción 90 fmoles inserto: 50 fmoles vector.

### **6.3.1. Transformación de las construcciones genéticas.**

La mezcla de ligación se transformó primeramente en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación química (Sambrook *et al.*, 1989); brevemente, el ADN y las bacterias fueron incubados a 0°C durante 30 minutos, luego las mezclas fueron incubadas durante 2 minutos a 42°C seguido de 2 minutos a 0°C. Posteriormente, se agregó 900 $\mu$ l de caldo LB precalentado a cada mezcla y se incubó con agitación a 37°C durante una hora. Finalmente se plaqueó 100 $\mu$ l de cada mezcla en agar LB suplementado con ampicilina. El remanente fue centrifugado a 4000rpm durante 10 minutos, el precipitado fue resuspendido en 100 $\mu$ l de caldo LB y luego sembrado en el agar mencionado previamente.

Luego de la selección de clones con inserto, análisis de restricción y verificación de la secuencia de los insertos por secuenciación, los plásmidos

resultantes seleccionados, pLV1 y pLO5, fueron transferidos por electroporación (Sambrook *et al.*, 1989) a la cepa *S. Typhimurium* SL5338, deficiente para el sistema de restricción del ADN no metilado de modo de evitar su degradación por los sistemas de restricción de *S. Typhimurium*. Posteriormente, se extrajeron los plásmidos propagados para ser transferidos por electroporación a la cepa destino *S. Typhimurium* SL1344.

### 6.3.2 Inactivación del gen *bla* codificado en el vector pBAD22.

Para evitar interferencias de la  $\beta$ -lactamasa codificada en el plásmido pBAD22 con la caracterización de las cepas productoras de VIM-2 y OXA-66 inducibles, se inactivó el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> endógeno del vector en las construcciones pLV1 y pLO5, así como también en el vector pBAD22 original. Para ello, se amplificó mediante PCR el gen de resistencia a kanamicina [*aph*(3')] usando como molde el vector pKD4 (Datsenko and Wanner, 2000). Se hizo una mezcla de PCR conteniendo 0,3mM de dNTPs, 2mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.3 $\mu$ M de los cebadores P1pvu y P2pvu, conteniendo el sitio de corte para la enzima de restricción *Pvu*I y secuencias que hibridan en regiones flanqueantes al gen *aph*(3') (Tabla 4). De igual manera a lo descrito en la sección anterior, se usó una mezcla de Taq y Pfu polimerasa, en una proporción 10U:1U. El programa de amplificación consistió de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 90 segundos.

El producto de PCR [*aph*(3') = 1481pb] fue digerido con *Pvu*I (Thermo Scientific) y ligado a los plásmidos pBAD22, pLO5 y pLV1 previamente digeridos con *Pvu*I. Dichos plásmidos poseen un único sitio de corte para *Pvu*I localizado dentro del gen *bla*<sub>TEM-1</sub>, por lo que la inserción del gen *aph*(3') anularía la actividad del gen *bla* y le conferiría a la construcción resistencia a kanamicina.

Los productos de ligación fueron luego transformados químicamente en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y la mezcla de transformación se plaqueó en agar LB conteniendo kanamicina. Las construcciones resultantes, denominadas pBAD22::kan, pLO5::kan y pLV1::kan, respectivamente, una vez verificadas por análisis de restricción se electroporaron en la cepa destino *S. Typhimurium* SL1344, previo pasaje intermedio por la cepa *S. Typhimurium* SL5338, de forma similar a lo descrito para las construcciones en pBAD22.

### 6.4 Construcción de las cepas productoras constitutivas de VIM-2 y OXA-66.

Para la expresión constitutiva de VIM-2 y OXA-66 en *S. Typhimurium* se usó un plásmido natural de tipo ColE1 denominado pST12 obtenido a partir de un aislamiento de *Salmonella* Derby (Vignoli *et al.*, 2006); dicho plásmido tiene un tamaño aproximado

de 8.2Kb y codifica para *bla*<sub>TEM-144</sub>, una β-lactamasa de espectro extendido con perfil de ceftazidimasa que se encuentra bajo el control del promotor P<sub>3</sub>; este plásmido posee además un transposón de la familia Tn3 insertado corriente arriba de dicho gen (Fig. 8).

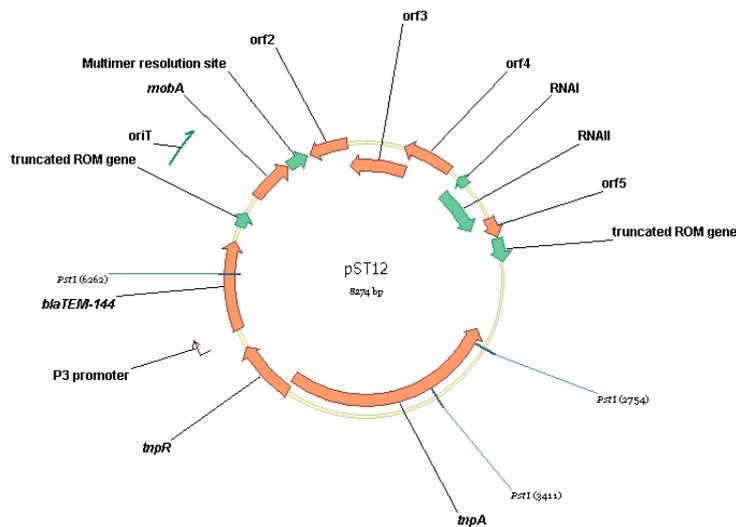


Figura 8. Mapa genético de pST12, mostrando las distintas estructuras que lo componen. Las líneas celestes indican los sitios de corte de la enzima *PstI*

La idea de este clonado es la obtención de plásmidos derivados de pST12, portando todos los elementos originales de este plásmido natural, excepto la β-lactamasa y el transposón, los cuales serían sustituidos por el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> o *bla*<sub>OXA-66</sub> clonados corriente abajo del promotor P<sub>3</sub>.

La estrategia empleada para clonar *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en el plásmido natural pST12 se resume en la Figura 9.

En primer lugar se cortó el plásmido pST12 con la enzima de restricción *PstI* generando un fragmento de 4.7kb carente del gen *bla*<sub>TEM-144</sub> y del transposón. Para evitar el religado se desfosforilaron los extremos 5' de dicho fragmento mediante tratamiento con *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (Invitrogen, Life Sciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de restricción se sometió a electroforesis en agarosa al 0.8% en *buffer* TBE 0.5X y se recuperó el fragmento de 4.7kb mediante el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen®).

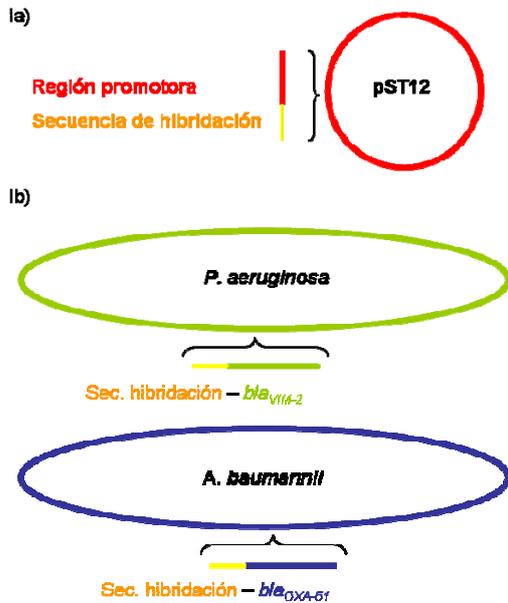
Por un lado, se amplificó mediante PCR la región promotora presente en pST12 usando el cebador prmF para la hebra codificante y los cebadores pvmRV y poxRV para la hebra complementaria, que incluían colas de hibridación para el extremo 5' de los genes *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub>, respectivamente (Tabla 4).

Por otro lado, *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub> se amplificaron usando los cebadores vmpFW - vmpRV y oxpFW - oxpRV, respectivamente; los cebadores para la hebra codificante contenían a su vez, una secuencia homóloga al extremo 3' de la región promotora,

mientras que los cebadores para la hebra complementaria contenían secuencias de corte de la enzima *Pst*I

Fase Ia) Amplificación mediante PCR de la región promotora de pST12 con un extremo 3' complementario al extremo 5' de los genes *bla*<sub>OXA-51</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>.

Fase Ib) Amplificación mediante PCR de los genes *bla*<sub>OXA-51</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> con un extremo 5' complementario al extremo 3' de la región promotora



Fase II) Creación mediante PCR de secuencias híbridas entre promotor de pST12 + *bla*<sub>OXA-51</sub> y pST12 + *bla*<sub>VIM-2</sub>



Fase III) Digestión del plásmido pST12 con la enzima *Pst*I y clonación de los insertos híbridos

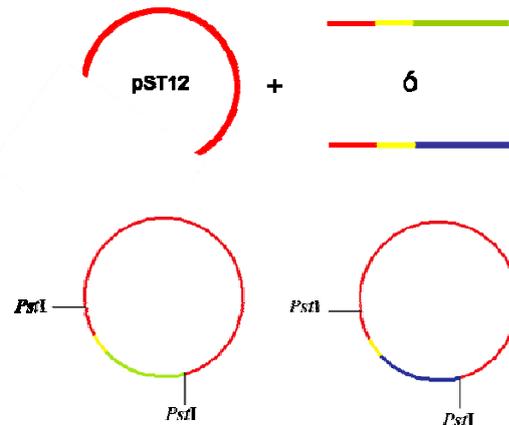


Figura 9. Esquema de la estrategia seguida para clonar los genes *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en el plásmido natural pST12.

En una tercera etapa, se realizó una reacción de PCR usando como molde una mezcla de los productos de PCR obtenidos previamente (cada promotor con su correspondiente  $\beta$ -lactamasa); en tal sentido la mezcla de PCR incluyó una relación equimolar de 75 ng de cada gen *bla* y 20 ng de cada promotor; la concentración final de los reactivos fue:  $[MgCl_2]_f=2mM$ ,  $[dNTPs]_f=0.2mM$ ,  $[Cebadores]_f=0.6\mu M$  c/u. La amplificación se llevó a cabo usando una mezcla de polimerasas Taq/Pfu en una proporción 10:1 y constó de dos etapas diferentes: A) una primera etapa dirigida a la hibridación del promotor con los distintos genes *bla* a través de la región de homología, y B) una segunda etapa destinada a la amplificación de las moléculas híbridas. Para ello, se realizó un ensayo de PCR que consistió en un ciclo de desnaturalización de 3 minutos a 94°C seguido por dos ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos (parte A). Posteriormente se agregaron los correspondientes cebadores (*prmF*, *vmpRV* o *oxpRV*) a la mezcla de reacción, y las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto (parte B).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la elaboración de las construcciones genéticas.

| Cebador                     | Secuencia (5'-3')   | Aplicación  | Sitio de corte para:         | Producto (pb) |
|-----------------------------|---|---|------------------------------|---------------|
| vimF <sup>a</sup>           | <u>TAGGAATTCACCA</u> <b>TG</b> TTCAAACCTTTTGAGTAAGT                                     | Amplificación de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> para clonar en pBAD22  | <i>Eco</i> RI                | 820           |
| vimR                        | ATAAAGCTT <u>AGCTACT</u> CAACGACTGAGCGA   |   | <i>Hind</i> III              |               |
| oxaF <sup>a</sup>           | CATGAATTCCTT <b>ATGA</b> ACATTAAAGCACTCTTAC   | Amplificación de <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> para clonar en pBAD22   | <i>Eco</i> RI                | 850           |
| oxaR                        | ACGTCTAGAT <b>CTA</b> TAAAATACCTAATTGTTCTAAG  |   | <i>Xba</i> I                 |               |
| pBAD5<br>pBADrev            | GTTTTATCAGACCGCTTCTGC<br>TTAGCGGATCCTACCTGACG   | Secuenciación del inserto en pBAD22   |                              | variable      |
| P1pvu <sup>b</sup><br>P2pvu | TCTTGACGATCG <b>GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC</b><br>TTAGCCCGATCG <b>CATATGAATATCCTCCTTAGAAC</b> | Amplificación de <i>aph</i> (3') a partir de pKD4   | <i>Pvu</i> I<br><i>Pvu</i> I | 1481          |
| prmF                        | TTACTGCAGTCTTGAAGACGAAAGGGCCT   | Amplificación del promotor P3 + cola de hibridación para <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> o <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> | <i>Pst</i> I                 | 227           |
| poxRV <sup>c</sup>          | <u>TGCTTTAATGTT</u> CATACTCTTCTTTTCAATAT  |   |                              |               |
| pvmRV <sup>c</sup>          | <u>CAAAAGTTTGAACATA</u> CTTCTTTTCAATAT  |   |                              |               |
| oxpFW <sup>d</sup>          | <u>AAAGGAAGAGTATGAAC</u> ATTAAAGCACTCTT   | Amplificación de <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> para clonar en pST12  | <i>Pst</i> I                 | 846           |
| oxpRV <sup>e</sup>          | AGCTGCAGCT <b>CTA</b> TAAAATACCTAATTGTTC  |   |                              |               |
| vmpFW <sup>d</sup>          | <u>AAGGAAGAGTATGTT</u> CAAACCTTTTGAGTAAG  | Amplificación de <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> para clonar en pST12   | <i>Pst</i> I                 | 821           |
| vmpRV <sup>e</sup>          | GTCTGCAGT <b>GCTACT</b> CAACGACTGAGC  |   |                              |               |
| pSTf<br>pSTr                | CGGTTCCGGTCCGGCATTGATTG<br>GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAG                                       | Secuenciación del inserto en pST12  |                              | variable      |

<sup>a</sup> Se subrayan las secuencias de corte para las enzimas de restricción, y en negrita se indican los codones de inicio y de terminación de la traducción de los cebadores *forward* y *reverse*, respectivamente.

<sup>b</sup> En negrita se marca las secuencias que hibridan con las regiones flanqueantes del gen *aph*(3') en el plásmido pKD4.

<sup>c</sup> La cola de hibridación con el extremo 5' de los genes *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> aparece subrayada.

<sup>d</sup> Se subraya la cola de hibridación con el extremo 3' del promotor P<sub>3</sub>, presente en el plásmido pST12.

<sup>e</sup> Se subraya el sitio de corte para *Pst*I y en negrita se marca el codón *stop* de *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, respectivamente.

Luego de realizar la purificación de los amplicones, se los sometió a un ensayo de restricción con la enzima *Pst*I (Fermentas) y posteriormente se realizó electroforesis en agarosa al 0.8% en *buffer* TBE 0,5X para recuperar la banda de ADN correspondiente a las fusiones para VIM-2 y OXA-66 (1068pb y 1092pb, respectivamente) usando el sistema QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen ®). Los insertos fusionados fueron clonados en el fragmento de 4.7kb resultante de la digestión del plásmido pST12 con *Pst*I, y la mezcla de ligación fue transformada químicamente en la cepa *E. coli* MC1061 (*recA*+) para lograr la reparación de los *nicks* presentes en pSTVIM producto de la desforilación de los extremos 5'. La mezcla de transformación se sembró en

placas de agar LB conteniendo ampicilina. Así, se obtuvo la construcción denominada pSTVIM (pST12::*bla*<sub>VIM-2</sub>). pSTVIM fue transferido mediante electroporación a la cepa *S. Typhimurium* SL5338 y finalmente a la cepa *S. Typhimurium* SL1344 empleando la misma metodología. La identidad del inserto se comprobó mediante secuenciación en ambas hebras usando los cebadores pSTf para la hebra codificante y pSTr para la hebra complementaria. Dichos cebadores hibridan corriente arriba y corriente abajo, respectivamente, del inserto.

A modo de control el plásmido pST12 fue electroporado en *S. Typhimurium* SL1344.

### **6.5 Obtención de extractos proteicos de las cepas LVR45 y LVR46.**

Las cepas LVR44, LVR45 y LVR46 fueron incubadas ON en caldo LB suplementado con kanamicina; a partir de dichos cultivos se hizo una dilución 1/100 en el mismo medio fresco precalentado y las diluciones fueron incubadas a 37°C con agitación suave (200rpm); luego de 90 minutos, las distintas cepas fueron inducidas con L-arabinosa 0.2% (concentración final) e incubadas durante otras 2 horas. Paralelamente, se cultivó la cepa LVR41 de modo similar pero en caldo LB suplementado con ampicilina.

Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas a 4000rpm durante 10 minutos, a 4°C; los sedimentos fueron resuspendidos en 10ml de buffer PBS estéril y fueron nuevamente centrifugados bajo iguales condiciones. Luego de descartar el sobrenadante, los precipitados fueron resuspendidos en 450 µl de *buffer* Tris 10mM, NaCl 50mM, pH 7.5; los mismos fueron sometidos a seis rondas de sonicación de 5 segundos c/u. Posteriormente a la sonicación se realizó una centrifugación de 30 min a 10.000rpm y 4°C en tubos *ependorff* para eliminar células enteras y se recuperó el sobrenadante, constituyendo el extracto proteico. Por otro lado, se obtuvieron también extractos proteicos de las mismas cepas pero cultivadas en ausencia del inductor.

La concentración de proteínas presentes en los extractos crudos fue estimada mediante la metodología de Bradford (Bradford M, 1976), siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, Saint Louis, Missouri). Brevemente, el agregado del reactivo de Bradford a proteínas en solución genera una reacción colorimétrica, que varía en función de la concentración de proteínas. Dicha reacción puede cuantificarse mediante lecturas de absorbancia a 570 nm.

Se analizó cada extracto resolviendo 50µg de proteínas de cada uno en SDS-PAGE al 15% y tinción con azul de Coomassie.

### **6.6 Determinación de la actividad enzimática de los extractos proteicos.**

Se probó la actividad  $\beta$ -lactamasa de los extractos proteicos obtenidos en el apartado 6.5, mediante el método iodométrico. Para ello, se depositaron 17  $\mu$ l de cada extracto (equivalente a 25  $\mu$ g de proteínas) sobre la superficie de una placa de Petri conteniendo agar (1.5%), almidón (0.5%), iodo/ioduro (0.05% p/v) y ampicilina (500 $\mu$ g/ml) como sustrato. Los extractos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, tomando imágenes cada 10 segundos mediante el sistema de captura G:Box EF2 (Syngene, Synoptics, Ltd.). Este ensayo se basa en la interacción química del almidón y el iodo, que forman un complejo púrpura al mezclarse. En presencia de una  $\beta$ -lactamasa, la penicilina (o aminopenicilina) es hidrolizada dando lugar al ácido penicilinoico; éste a su vez convierte al iodo en ioduro ( $I_2 \rightarrow 2I^-$ ). De este modo el iodo deja de estar disponible para la formación del complejo  $I_2$ -almidón, desapareciendo la coloración púrpura en el área del ensayo (Oberhofer and Towle, 1982), lo que se traduce como un halo transparente en torno a la muestra sembrada.

### **6.7 Determinación del perfil de resistencia de las cepas LVR45 y LVR46.**

La determinación fenotípica de la expresión de las  $\beta$ -lactamasas clonadas en los distintos vectores se realizó mediante un ensayo de disco-difusión basado en los lineamientos del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Brevemente, se preparó una suspensión bacteriana de cada cepa con una turbidez equivalente a 0.5 en la escala McFarland (equivalente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml) en suero fisiológico estéril. Luego, dichas suspensiones fueron sembradas de manera confluyente, con un hisopo estéril, en placas de medio Mueller-Hinton sin y con 0.05% de L-arabinosa (para inducir la expresión de los genes clonados). Se ensayaron distintos  $\beta$ -lactámicos como ampicilina, cefalotina, cefotaxime, ceftazidime, imipenem y meropenem. Además se colocaron discos conteniendo 2.5  $\mu$ Moles de EDTA para evidenciar el efecto inhibitorio sobre la enzima VIM-2. A modo de control se incluyó en este ensayo la cepa *S. Typhimurium* SL13444 *wild type* (WT) y las cepas LVR41 o LVR44.

### **6.8 Determinación de alteraciones macroscópicas por la expresión de $\beta$ -lactamasas.**

Se evaluó la presencia o ausencia de cambios en la morfología colonial de *S. Typhimurium* SL1344 transformada con las distintas construcciones genéticas. Para ello se sembró mediante "rastrillado" 10  $\mu$ l de suspensiones bacterianas conteniendo  $1.5 \times 10^4$  UFC/ml (~ 150 UFC) en placas de Petri con el medio TSA-sangre ovina (5%)

sin y con ampicilina y concentraciones crecientes de L-arabinosa (0%, 0.05% y 0.1%). Se incluyó como controles a las cepas *S. Typhimurium* SL1344 WT (en este caso solo se observó crecimiento en ausencia de antibiótico), y las cepas LVR41 y LVR47. Las placas fueron incubadas ON a 37°C y en aerobiosis. La búsqueda de alteraciones macroscópicas en la cepa transformada con el plásmido pSTVIM se hizo de manera similar pero en TSA-sangre ovina sin arabinosa.

### **6.9 Determinación de la movilidad de las cepas transformadas.**

Para comprobar si la expresión de VIM-2 y OXA-66 afecta la capacidad de movimiento de *S. Typhimurium*, se llevó a cabo un ensayo *in vitro* de movilidad de las cepas LVR45 y LVR46 en medio LB con agar al 0.3% (Yim *et al.*, 2011), suplementado con distintas concentraciones de inductor. Para ello, a partir de un cultivo ON se hizo una dilución 1/100 de las distintas cepas en caldo LB precalentado y suplementado con kanamicina. Luego de dos horas de incubación a 37°C con agitación (200 RPM), se sembraron 2 µl de cada muestra sobre la superficie de placas de Petri conteniendo LB agar 0.3%, kanamicina y L-arabinosa en distintas concentraciones (0%, 0.05% y 0.1%). Las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C y a las 6 horas se midieron los halos de movilidad.

La movilidad de las cepas LVR47 y LVR48 se analizó de modo similar al descrito aquí pero suplementando el medio con ampicilina, y sin el agregado de arabinosa.

En todos los casos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **6.10 Determinación de la cinética de crecimiento.**

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento para ver si la expresión de las distintas β-lactamasas afectaba o no el *fitness* de la cepa en estudio (O'Regan *et al.*, 2010). Para ello las cepas LVR44, LVR45 y LVR46 fueron cultivadas ON en LB suplementado con kanamicina; posteriormente, se realizó una dilución 1/100 en caldo LB precalentado y suplementado con kanamicina y se dejó incubando en aerobiosis a 37°C y en agitación (200 RPM). Luego de 1 hora de incubación se fraccionaron en dos los cultivos y a una mitad se le agregó 0.05% (p/v) del inductor; mientras que a la otra no se le agregó azúcar alguno. Con la finalidad de prolongar la fase exponencial de crecimiento y facilitar la detección de posibles alteraciones en las tasas de crecimiento, a las dos y tres horas de comenzado el ensayo los distintos cultivos fueron diluidos ¼ y 1/5, respectivamente con caldo LB precalentado y conteniendo las cantidades correspondientes del inductor y kanamicina. Durante todo el ensayo, se tomaron lecturas de densidad óptica a 600nm (OD<sub>600</sub>) a intervalos regulares (30 minutos) hasta alcanzada la fase estacionaria de crecimiento.

Las curvas de crecimiento para las cepas LVR47 y LVR48 se realizaron de modo similar al descrito arriba pero suplementando el caldo LB con ampicilina y sin el agregado de Ara.

En todas las instancias los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **6.11 Evaluación de la invasividad.**

### **6.11.1 Determinación del número de células viables.**

Previo a los ensayos de invasividad se determinó el número de UFC/ml para una  $OD_{600}=0.4$ , con el objetivo de definir el inóculo bacteriano necesario a adicionar a las células para lograr una multiplicidad de infección (MOI) deseada.

A partir de cultivos ON en LB y ampicilina de las cepas LVR41, LVR42 y LVR43, se hizo una dilución 1/100 en LB precalentado y suplementado con la misma cantidad de antibiótico; las diluciones fueron incubadas a 37°C en agitación (200 RPM). Luego de una hora de incubación se fraccionaron en dos los cultivos de las cepas anteriormente mencionadas para tener un juego de cepas inducidas con Ara 0.05% y un juego sin inducir. Luego de una hora de inducción, todos los cultivos fueron diluidos  $\frac{1}{4}$  con LB precalentado y conteniendo las cantidades correspondientes del inductor y antibiótico, y fueron incubados durante otra hora hasta que alcanzaron una  $OD_{600}=0.4$ . Se midió la  $OD_{600}$  al inicio del ensayo ( $t_0$ ) y cada 60 minutos hasta que los cultivos alcanzaron la  $OD_{600}$  deseada. Cuando se alcanzó la  $OD_{600}$  deseada se realizaron diluciones seriadas de los distintos cultivos en buffer fosfato salino estéril (PBS pH7.4) y se sembraron en agar LB (con y sin ampicilina) 20  $\mu$ l x 3 de las diluciones -5 y -6 para posterior conteo de las CFUs.

El conteo de células viables para las cepas LVR47 y LVR48 fue realizado de modo similar pero sin inducción. En ambas instancias los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **6.11.2 Determinación de la viabilidad en EMEM y susceptibilidad a gentamicina.**

Se verificó la capacidad de las cepas mencionadas en el apartado anterior de tolerar el medio para cultivos celulares Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) con los mismos suplementos usados para el cultivo de células Caco-2, además de la susceptibilidad de las mismas a la gentamicina. A partir de cultivos ON en LB suplementado con ampicilina se realizaron diluciones 1/100 en LB precalentado y con la misma cantidad de antibiótico. Las diluciones fueron incubadas a 37°C en agitación (200 RPM) hasta que los cultivos alcanzaron una  $OD_{600}\sim 0.4$ . Se agregó un volumen de cada cepa equivalente a una  $MOI\sim 30$  a 1 ml de medio EMEM precalentado, las

suspensiones se homogeneizaron en un *vórtex* y se incubaron una hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se tomó una alícuota de 100 µl de cada suspensión para realizar diluciones seriadas en PBS estéril y sembrar (3 x 20 µl) en agar LB las diluciones -4 y -5 para el posterior conteo de CFU y comparación con los valores obtenidos para las cepas ensayadas a la misma OD<sub>600</sub> pero sin incubar en EMEM.

Por otra parte, se agregó al volumen restante de las suspensiones en EMEM (900 µl) una solución de gentamicina (40mg/ml) hasta llegar a una concentración final de 100µg/ml. Cada suspensión fue transferida a sendos pocillos en placas de cultivo celular e incubada a 37°C en aerobiosis (+5% CO<sub>2</sub>) durante 90 minutos. Luego, el contenido de cada pocillo fue homogeneizado, y se sembró 3 x 20 µl de cada suspensión bacteriana en placas de agar LB para verificar la ausencia de crecimiento.

### 6.11.3 Ensayos de invasividad celular.

Para los ensayos de invasividad se empleó la línea celular Caco-2 derivada de carcinoma colorrectal humano (Levy *et al.*, 1995), obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Se ha demostrado que esta línea celular reproduce *in vitro* mucha de las propiedades de los enterocitos observadas *in vivo* y es por tanto un modelo ampliamente utilizado de la interacción *Salmonella*-hospedador (Haque *et al.*, 2004; Kim and Wei, 2007). Las células se mantuvieron en EMEM (PAA Cat# E15-024), suplementado con L-glutamina 2mM, aminoácidos no esenciales 0.0814 g/L, piruvato sódico 0.11 g/L y suero fetal bovino 10%, a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para los ensayos de invasión, las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos (5x10<sup>4</sup> cél/pocillo) e incubadas durante 72h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, cambiándoles el medio a las 48hs de sembradas.

Las cepas LVR41, LVR42 y LVR43 fueron crecidas como se describe en el apartado 6.11.1 hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial y fueron agregadas a las células Caco-2 a una MOI~30:1 en el mismo medio de las células. Cada cepa fue sembrada por triplicado; como control negativo siempre se ensayó en paralelo un pocillo sin infectar. Las placas fueron centrifugadas a 200 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente (para contrarrestar posibles diferencias en la invasión debidas a la menor movilidad observada para ciertas cepas), y luego se incubaron durante una hora a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS estéril precalentado, se cambió el medio (EMEM) por el mismo conteniendo 100µg/ml de gentamicina y se dejó incubando durante 90 minutos para eliminar a las bacterias extracelulares. Se realizaron siembres del sobrenadante en agar LB para confirmar la ausencia de bacterias extracelulares. Posteriormente, las células fueron lavadas tres

veces con PBS y tratadas durante 15 minutos con el detergente Tritón X-100 a 0.1% en agua milliQ estéril para lograr la lisis celular y la liberación de las bacterias intracelulares. Los lisados celulares fueron diluidos seriadamente en PBS estéril y se sembraron (3 x 20  $\mu$ l) las diluciones -1 y -2 en LB agar. Paralelamente se sembraron diluciones seriadas (-4 y -5) de los inóculos bacterianos iniciales para verificar que los inóculos eran correctos. Se realizaron tres réplicas biológicas de los ensayos de invasividad para el análisis estadístico de los resultados.

## **6.12 Determinación de los niveles de expresión de *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>.**

### **6.12.1 Extracción de ARN.**

La extracción de ARN total se llevó a cabo usando el *kit* comercial RNeasy Protect (Qiagen ®). A partir de cultivos ON, se realizó una dilución 1/100 en caldo LB suplementado con ampicilina. Luego de una hora de incubación a 37°C con agitación se realizó la inducción de las cepas LVR41, LVR42 y LVR43 con Ara 0.05% y fueron incubadas durante otros 60 minutos, hasta que alcanzaron una OD<sub>600</sub>~0.4-0.8. En paralelo se crecieron controles sin inducir además de la cepa WT. La cepa LVR48 fue cultivada de manera similar pero sin el agregado de arabinosa.

Por cada cepa se transfirió una cantidad de bacterias correspondiente a 5x10<sup>8</sup>-7.5x10<sup>8</sup> UFC a un tubo de minicentrífuga y se las trató con 2 volúmenes del reactivo RNAprotect; luego de homogeneizar las mezclas, se incubó a TA durante 5 minutos y fueron centrifugadas a 5000 x g durante 10 minutos. Luego de remover el sobrenadante, se almacenaron los precipitados bacterianos a -20°C hasta su posterior procesamiento. La extracción y purificación del ARN bacteriano se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se determinó la concentración y la calidad de los ARN extraídos mediante lecturas de absorbancia a 260nm (A<sub>260</sub>) y la relación entre A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, respectivamente, con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.); dicha relación brinda una medida de la contaminación de los ácidos nucleicos con proteínas.

### **6.12.2 Tratamiento con DNasa.**

Previo al paso de retro-transcripción se procedió a la remoción del ADN contaminante presente en las extracciones de ARN total. Brevemente, se agregó 0.4 UI de DNasa (Invitrogen) por 100 ng de ARN total de cada muestra; las mezclas fueron incubadas durante 15 minutos a TA y luego se procedió a inactivar la enzima agregando 2.5mM de EDTA e incubando a 65°C durante 10 minutos.

### 6.12.3 Transcripción Reversa (RT).

La síntesis del ADN copia (cADN) se realizó usando la enzima M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (Invitrogen). Los 100ng de ARN de cada cepa tratados con DNAsa fueron agregados a una mezcla de reacción conteniendo 0,2 µg de Random Hexamer primers, 0.5mM dNTPs, 10mM DTT (ditiotreitól), 40 UI RNase OUT y 200 UI de la enzima M-MLV reverse transcriptase, en un volumen total de 20 µl. La mezcla de reacción fue incubada por un ciclo de 10 minutos a 25°C, seguido de un ciclo de 50 minutos a 37°C y finalmente 15 minutos a 70°C para inactivar la enzima. El ADN copia generado se diluyó 1/16 en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

### 6.12.4 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

#### 6.12.4.1 Cebadores.

Los cebadores utilizados para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (mARN) de *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub> fueron diseñados con ayuda del algoritmo Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012), a partir de las secuencias obtenidas en la secuenciación de los insertos clonados (y verificadas con las ingresadas en la base de datos pública GENBANK), y se describen en la tabla 5.

Para las cepas LVR41, LVR42 y LVR43 se usó en primera instancia, el gen que codifica para el rARN 16S como gen normalizador. Posteriormente, se optó por usar el gen *bla*<sub>TEM</sub> presente en el vector pBAD22 como control endógeno, y de esa forma se logró eliminar la variación debida a posibles fluctuaciones en el número de copias plasmídicas. Para los ensayos con la cepa LVR48, el control endógeno fue el gen rADN 16S, ya que no se tenía ningún gen del plásmido pST12 para utilizar como normalizador para cubrir la posible variación en el número de copias plasmídicas.

Tabla 5. Cebadores diseñados para los ensayos de Real-Time PCR. Se indica la secuencia de los mismos, los genes blanco y el tamaño (en pares de bases) de los productos de amplificación.

| Gen Blanco                   | Cebador | Secuencia (5'-3')          | Producto (pb) |
|------------------------------|---------|----------------------------|---------------|
| <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>  | Forward | GCGAAATTCGGTCGGGGAGG       | 182           |
|                              | Reverse | CGCGAGAAGTGCCGCTGTGT       |               |
| <i>bla</i> <sub>OXA-66</sub> | Forward | GCCTGCTCACCTTATATAGTGACTGC | 178           |
|                              | Reverse | ACTCGGTCGAAGCACGAGCA       |               |
| rARN 16S                     | Forward | TGTAGCGGTGAAATGCGTAG       | 161           |
|                              | Reverse | CAAGGGCACAACTCCAAG         |               |
| <i>bla</i> pBAD              | Forward | CTTCTGCGCTCGGCCCTTCC       | 76            |
|                              | Reverse | TACCGCGAGACCCACGCTCA       |               |

#### 6.12.4.2 PCR.

La PCR en tiempo real se llevó a cabo empleando el *kit* comercial QuantiTech SYBR Green PCR (Qiagen ®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l, conteniendo 5  $\mu$ l de QuantiTech SYBR Green mix, 0,3 $\mu$ M de ambos cebadores y 2  $\mu$ l de una dilución 1/16 del cADN. Las reacciones de PCR se realizaron en el Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) y en la plataforma ABI 7900HT (Applied Biosystems). Las muestras fueron desnaturalizadas inicialmente a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. Al finalizar la reacción se realizó una curva de disociación a 70°C incrementando 1°C cada 5 segundos hasta alcanzar una temperatura de 99°C.

Para cada par de cebadores utilizados se verificó primero que la eficiencia de la amplificación fuera cercana al 100% y similar entre el gen normalizador y el gen problema, amplificando por PCR en tiempo real diluciones seriadas de cada cADN, y graficando luego el  $\Delta C_T$  ( $C_T$  gen normalizador –  $C_T$  gen problema) en función de la dilución. En esta gráfica, la pendiente debe ser cercana a cero.

Una vez realizado esto, se llevó a cabo la cuantificación relativa de los mRNA presentes en cada muestra siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmitthen, 2001). Brevemente, se obtuvo el valor de  $C_T$  para el gen normalizador (16S o *blapBAD*) y para los genes problemas (*bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>) en condiciones de inducción y no inducción; se determinó el  $\Delta C_T$  para cada condición ( $C_{T16S \text{ rRNA}} - C_{T\beta\text{-lactamasa}}$  o  $C_{T\text{blapBAD}} - C_{T\beta\text{-lactamasa}}$ ) y finalmente se calculó el valor de  $2^{\Delta\Delta C_T}$  como:  $2^{\Delta C_T}$  (inducción) /  $2^{\Delta C_T}$  (no inducción). Así, los resultados expresan el número de veces que aumentaron los niveles de mRNA para cada  $\beta$ -lactamasa en las cepas inducidas con respecto a las cepas no inducidas (*fold change*).

#### 6.13 Análisis del efecto de la síntesis de *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en la estabilidad plasmídica.

Se estudió la capacidad de *S. Typhimurium* SL1344 de mantener la expresión de *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en ausencia de presión de selección por antibiótico modificando el protocolo descrito por Medina y cols. (Medina *et al.*, 2011). Brevemente, las cepas LVR44, LVR45 y LVR46 fueron incubadas ON en caldo LB suplementado con kanamicina; luego se realizó una dilución 1/200 de los cultivos en caldo LB fresco precalentado. Luego de una hora de incubación, los cultivos fueron fraccionados en dos, para tener un juego de cepas inducidas con Ara 0,05% y un juego de cepas

reprimidas con Glu 0,05%; ambos sets de cepas fueron incubados durante otras 11 horas. Pasado este tiempo, se realizaron cada 12 horas, otras dos diluciones 1/200, con caldo LB fresco precalentado conteniendo las cantidades respectivas de arabinosa o glucosa. Finalmente, las muestras fueron recolectadas cuando alcanzaron una OD<sub>600</sub> ~ 0.8 (aproximadamente 23 generaciones en total); se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril, y se sembraron en agar LB (con y sin kanamicina) 3 x 10 $\mu$ l de las diluciones -4, -5 y -6 para posterior conteo de las CFUs. La proporción de bacterias que aún portaban plásmidos se estimó calculando las CFUs/ml obtenidas en las placas de LB con kanamicina vs. las obtenidas en LB sin antibiótico para cada condición (inducción y represión).

## **PARTE II**

### **6.14 Estudios de *fitness* en *Salmonella* productora de AmpC.**

Se incluyeron en este trabajo dos aislamientos clínicos de *S. Typhimurium* (STM709 y STM910) con perfiles de resistencia compatibles con la presencia de *ampC* plasmídica. Dichos aislamientos fueron obtenidos a partir de niños con diarrea internados en centros de cuidados terciarios en Montevideo en julio de 2009 y setiembre de 2010, respectivamente. Por otra parte se incluyó la cepa STM23 como control; la misma es un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* identificado a partir de un caso de diarrea, pero sensible a cefalosporinas de tercera generación (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas y plásmido correspondientes a la Parte II de la presente tesis

| <b>Cepa/plásmidos</b>  | <b>Genotipo/Fenotipo</b>  | <b>Origen/referencias</b>      |
|--|---|--------------------------------|
| <b>Cepas bacterianas</b>   |   |                                |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium str. STM709 | Aislamiento clínico obtenido de un niño con diarrea, 2009; <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> <sup>+</sup> | Cordeiro <i>et al.</i> , 2013. |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium str. STM910 | Aislamiento clínico obtenido de un niño con diarrea, 2010; <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> <sup>+</sup> | Cordeiro <i>et al.</i> , 2013. |
| <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium str. STM23  | Aislamiento clínico obtenido de un paciente con diarrea, 2009; sensible a $\beta$ -lactámicos.      | Cordeiro <i>et al.</i> , 2013. |
| <b>Plásmidos</b>   |   |                                |
| pSTM709  | Incl1, <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> , Amp <sup>R</sup> , <i>pndAC</i> , conjugativo.                 | Cordeiro <i>et al.</i> , 2013. |

### 6.14.1 Determinación del perfil de resistencia.

El perfil de resistencia de las cepas STM709, STM910 y STM23 se determinó con el sistema automatizado VITEK2 Compact system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia); los resultados fueron interpretados de acuerdo a las guías CLSI. Los valores de concentración inhibitoria mínima de las cepas (donantes, receptoras y transconjugantes) se determinaron mediante Etest, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### 6.14.2 Identificación del gen *ampC*.

La presencia de alelos *ampC* se determinó mediante múltiplex PCR (Pérez-Pérez *et al.*, 2002). Brevemente, dicho ensayo incluye seis pares de cebadores (Tabla 7) separados en dos mezclas de reacción distintas conteniendo 3 pares cada una.

Las mismas se prepararon de modo tal que la concentración final de los reactivos fue:  $[MgCl_2]_f=1.5mM$ ,  $[dNTPs]_f=0.2mM$ ,  $[Cebadores]_f=0.6\mu M$  c/u.

Las condiciones de ciclado fueron: una etapa de desnaturalización de 3.5 minutos a 94°C seguida de 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 64°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis en agarosa 1% (p/v) en *buffer* TBE 0,5X y posterior tinción con bromuro de etidio. La identidad de los productos de PCR se determinó mediante secuenciación de ambas hebras con los cebadores correspondientes al producto de amplificación.

Tabla 7. Cebadores para la *múltiplex* PCR para alelos *ampC*.

| Blanco                   | Cebador | Secuencia (5'-3')       | Producto (pb) |
|--------------------------|---------|-------------------------|---------------|
| MOX-1, MOX-2,            | MOXMF   | GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT   | 520           |
| CMY-1, CMY8 a<br>11      | MOXMR   | CACATTGACATAGGTGTGGTGC  |               |
| LAT-1 a LAT-4,           | CITMF   | TGGCCAGAACTGACAGGCAA    | 462           |
| CMY-2 a CMY-<br>7, BIL-1 | CITMR   | TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC   |               |
| DHA-1, DHA-2             | DHAMF   | AACCTTTCACAGGTGTGCTGGGT | 405           |
|                          | DHAMR   | CCGTACGCATACTGGCTTTGC   |               |
| ACC                      | ACCMF   | AACAGCCTGAGCAGCCGGTTA   | 346           |
|                          | ACCMR   | TTCGCCGCAATCATCCCTAGC   |               |
| MIR-1T, ACT-1            | EBCMF   | TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG   | 302           |
|                          | EBCMR   | CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT   |               |
| FOX-1 a FOX-<br>5b       | FOXMF   | AACATGGGGTATCAGGGAGATG  | 190           |
|                          | FOXMR   | CAAAGCGCGTAACCGGATTGG   |               |

### 6.14.3 Ensayos de conjugación.

Para comprobar que el gen *ampC* se encontraba codificado en plásmidos se realizó una variante del ensayo de conjugación descrito por Shin *et al.* (Shin *et al.* 2009), usando la cepa *E. coli* J53-2 (resistente a rifampicina) como receptora. A partir de cultivos crecidos ON en caldo LB, se realizó una dilución 1/100 en LB fresco y se incubó en agitación (200 RPM) a 37°C durante dos horas. Se agregaron 200 µl de cada cepa donante (STM709 y STM910) a 2 ml de la cepa receptora y se incubó estáticamente a 37°C durante tres horas. Posteriormente se plaquearon alícuotas de 10 µl y 100 µl de cada mezcla de conjugación en agar McConkey lactosa suplementado con 150µg/ml de rifampicina y 100µg/ml de ampicilina; asimismo se plaquearon volúmenes similares de la cepa receptora y de ambas cepas donantes como controles. Las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche.

### 6.14.4 Caracterización plasmídica.

El tamaño de los plásmidos conjugativos se estimó mediante tratamiento con la nucleasa S1 (Fermentas, Life Sciences) y posterior electroforesis en campo pulsado (Barton *et al.*, 1995). Para ello se armaron bloques conteniendo 150µl de una suspensión OD<sub>600</sub>=1.4, 7.5µl de proteinasa K (20mg/ml) y 150µl de agarosa al 1% con SDS 1%. Luego los bloques fueron dejados en buffer de lisis (50mM Tris, 50mM EDTA, pH8, 1% sarcosina p/v, 0,1mg/ml proteinasa K) e incubados ON en un baño a 55°C con agitación. Luego, los bloques fueron sumergidos cuatro veces (15 min c/u) en *buffer* TE 1X a 55°C con agitación. Posteriormente, fueron incubados con 1U de nucleasa S1 durante 45 min. a 37°C. La electroforesis en campo pulsado se realizó en agarosa al 1% bajo las siguientes condiciones: pulso inicial=2.2 seg., pulso final=54.2 seg., campo eléctrico=6 V/cm, tiempo de corrida=18 horas. Finalizada la corrida electroforética el gel fue teñido con bromuro de etidio y los resultados se visualizaron en un transiluminador UV. El tamaño aproximado de los plásmidos se obtuvo extrapolando las distancias de migración en una curva realizada en papel semilogarítmico.

El grupo de incompatibilidad plasmídico y la presencia de sistemas toxina-antitoxina se determinó mediante PCR con cebadores previamente descritos (Carattoli *et al.*, 2005; Mnif *et al.*, 2010), usando como molde ADN total de las cepas transconjugantes.

#### 6.14.4.1 Extracción del plásmido de resistencia pSTM709.

Luego de la caracterización parcial del plásmido codificante de *bla*<sub>CMY-2</sub> de la cepa *S. Typhimurium* STM709, se decidió secuenciar el mismo para determinar la

existencia de otros genes que pudiesen explicar las alteraciones fenotípicas observadas para dicha cepa.

La extracción del ADN plasmídico se hizo usando el sistema comercial QIAGEN *Plasmid Maxi kit*, siguiendo una modificación del protocolo provisto por el fabricante. Específicamente, a partir de un cultivo de 8hs en caldo LB se hizo una dilución 1/500 en un litro de caldo LB, incubando ON a 37°C en agitación. Luego de centrifugar, el precipitado bacteriano fue resuspendido en 40ml del *buffer* P1 y se agregaron 40ml del *buffer* P2, homogeneizando la mezcla por inversión e incubando a temperatura ambiente durante 5min; posteriormente se agregaron 40ml del *buffer* P3 a 0°C, se mezcló vigorosamente por inversión y se dejó incubando en hielo durante 30min. Luego de centrifugar dos veces a 20.000 X g, conservando el sobrenadante en ambas instancias, se filtró la muestra usando 2 *Maxicartridges* provistos por el fabricante. El ADN se precipitó mediante la adición a temperatura ambiente de 84ml de isopropanol (0,7 volúmenes), centrifugando luego la mezcla a 15.000 X g durante 30min y descartando el sobrenadante. Se disolvió el precipitado de ADN en 500µl de *buffer* TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH8.0) y se llevó a un volumen final de 12ml con *buffer* QBT; la solución resultante de ADN fue pasada luego por una columna de afinidad QIAGEN-tip 500 y lavada dos veces con 30ml de *buffer* QC. Posteriormente se eluyó el ADN en 15ml de *buffer* QN precalentado y se lo precipitó con 10,5ml (0,7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente. Luego de mezclar y centrifugar a 15.000 X g durante 10min. el precipitado fue lavado con 5ml etanol 70% y vuelto a centrifugar bajo las mismas condiciones. Finalmente, el ADN se resuspendió en 200µl de *buffer* EB (Tris-HCl, 10mM, pH8.5).

El rendimiento de la extracción de ADN plasmídico se cotejó mediante cuantificación con Nanodrop y la pureza por electroforesis en agarosa 0,7% y tinción con bromuro de etidio.

#### **6.14.4.2 Secuenciación y anotación de pSTM709.**

La secuenciación del plásmido pSTM709 fue realizada en colaboración con el laboratorio Genia Geo (Zonamérica). Brevemente, el ADN plasmídico fue fragmentado mediante digestión enzimática generando fragmentos de aproximadamente 200pb para la biblioteca de ADN. Posteriormente, se generó el molde mediante la amplificación de la biblioteca en el sistema Ion One Touch (Life Technologies); el ADN se cargó en un chip 314 (Life Technologies) y se secuenció en el sistema Ion PGM sequencer (Life Technologies). La información generada fue analizada en el servidor Torrent (Torrent Suite 3.2.1), empleando además el *plug-in* Assembler 3.1.0 para el ensamblaje de los *reads*. El análisis de la secuencia resultante fue realizado mediante

los algoritmos BLASTn y BLASTx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), y Rfam (<http://rfam.sanger.ac.uk/search/sequence>); la anotación parcial de pSTM709 se hizo con ayuda del paquete informático Vector NTI Advance (TM) 11.0 © 2008 (Invitrogen Corporation).

#### **6.14.5 Tipificación molecular de los aislamientos.**

En virtud de que las cepas STM709 y STM910 presentaban patrones de resistencia a antibióticos y perfil plasmídico similares, se analizó el parentesco genómico mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE) y *multilocus sequence typing* (MLST).

##### **6.14.5.1 PFGE.**

De modo similar a lo descrito en el apartado 6.14.4, se prepararon bloques de agarosa con las cepas STM709 y STM910. Los mismos fueron incubados con 30U de *Xba*I a 37°C durante 18 horas. Se usó la cepa *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 como control y la corrida de campo pulsado se hizo de acuerdo a las guías PulseNet (Swaminathan *et al.*, 2001). Los resultados fueron interpretados de acuerdo al criterio de Tenover y cols. (Tenover *et al.*, 1995): aislamientos genéticamente indistinguibles presentan el mismo número de bandas y con el mismo tamaño aparente; aislamientos cercanamente emparentados presentan diferencias de 2 ó 3 bandas; aislamientos posiblemente emparentados difieren en 4-6 bandas; aislamientos no emparentados presentan más de 7 bandas diferentes.

##### **6.14.5.2 MLST.**

Paralelamente se caracterizó a STM709 y STM910 mediante *multilocus sequence typing*, de acuerdo a las instrucciones descritas en <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>. Para ello se analizó mediante PCR y secuenciación con cebadores para fragmentos internos de siete genes *housekeeping* de *S. enterica*: *thrA* (aspartokinasa y homoserina deshidrogenasa), *purE* (fosforibosil aminoimidazol deshidrogenasa), *sucA* ( $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa), *hisD* (histidinol deshidrogenasa), *aroC* (corismato sintasa), *hemD* (uroporfirinógeno III cosintasa) y *dnaN* (ADN polimerasa III, subunidad  $\beta$ ).

#### **6.14.6 Búsqueda de genes de virulencia.**

De acuerdo a lo publicado por Betancor y cols. (Betancor *et al.*, 2010; Betancor *et al.*, 2009), se buscó mediante PCR la presencia de genes que codifican para efectores secretados por sistemas de secreción tipo III (*avrA*, *sopE*), genes del plásmido de virulencia de *Salmonella* (*spvC*, *pefA*), la isla genómica CS54 de *S. Typhimurium*

(*shdA*, *sivH*) y genes de profagos (*gogB*, *Sb41*). Como control interno se usaron además cebadores específicos para *invA* (gen universal al género *Salmonella*).

#### 6.14.7 Evaluación del *fitness* de STM709 y STM910.

Los ensayos de movilidad, curvas de crecimiento e invasividad celular para las cepas STM709 y STM910 se llevaron a cabo como se describió previamente para las construcciones con *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, con las siguientes modificaciones: las cepas fueron crecidas en presencia de ampicilina 100µg/ml, sin el agregado de arabinosa, ni diluciones del cultivo durante el desarrollo de las curvas de crecimiento.

#### 6.14.8 Análisis del lipopolisacárido.

Como la cepa STM709 mostraba una tendencia a la autoaglutinación, se decidió realizar un estudio del lipopolisacárido (LPS) tanto a STM709 como a STM910. La extracción del LPS se llevó a cabo modificando el protocolo descrito por Hitchcock y cols. (Hitchcock and Brown, 1983). A partir de cultivos ON en caldo LB, se centrifugaron 3ml de cada cepa por 10 minutos a 5000 RPM; los precipitados bacterianos fueron resuspendidos en 150µl de buffer PBS y fueron mezclados con 75µl de buffer LPS-1 (Tris-HCl 0.1875M, pH6.8, SDS 6% (p/v), glicerol 30% (v/v)). Las mezclas fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos; se tomó una alícuota de 20µl de cada mezcla y se agregaron 70µl de buffer LPS-2 (Tris-HCl 0.0625M, pH6.8, SDS 0.1% (p/v), glicerol 10% v/v, azul de bromofenol 0.1% (p/v)) y 20µl de proteinasa K (10mg/ml). Las nuevas mezclas fueron incubadas ON a 55°C y calentadas a 100°C previo a la corrida electroforética. La misma se realizó en un gel tricina con poliacrilamida al 16% a voltaje constante (Schägger H, 2006). Los resultados se visualizaron siguiendo un protocolo modificado de tinción con nitrato de plata (Tsai and Frasch, 1982). Brevemente, una vez finalizada la corrida electroforética el gel de poliacrilamida fue incubado ON con agitación en una solución de fijación (25% 2-propanol (v/v); 7% ác. acético (v/v)). Posteriormente, el gel fue enjuagado y lavado en agitación tres veces (10 min. c/u) con H<sub>2</sub>Omq. Luego, el gel fue incubado durante 5 min. en una solución de oxidación (0.7% ác. peryódico (p/v)) y lavado como en el paso anterior. La tinción se realizó incubando el gel durante 5 min. en una solución de nitrato de plata (0.6% AgNO<sub>3</sub> (p/v); 0.0168M NaOH; 1.2% NH<sub>4</sub>OH (v/v)); luego de tres lavados con H<sub>2</sub>Omq, se sumergió el gel en una solución de revelado (0.03% formaldehído (v/v); 0.26mM ác. cítrico) hasta la aparición de bandas de LPS. El proceso de revelado fue detenido transfiriendo el gel a una solución de 7% ác. acético.

#### 6.14.9 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

La cuantificación de mRNA para *bla*<sub>CMY-2</sub> se realizó de manera similar a lo descrito para las construcciones con *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, con las siguientes modificaciones: como control interno se usó el gen normalizador *icdA* (isocitrato deshidrogenasa). El mismo no pudo ser usado antes dado que la inducción con arabinosa podía alterar la expresión de *icdA*. Se partió además, de 1 µg de ARN y se trabajó con una dilución 1/128 de cADN. Por otra parte, los cebadores usados fueron *icdA*-F: 5'-TGGTATCGGTGTTGATGTCCTC-3'; *icdA*-R 5'-CATCCTGGCCGTAACCTGTGTG-3'; CMY2-F: 5'-CCGCCTGCTGCACTTAGCCA-3'; CMY2-R: 5'-CCCGGAGTCCATTGCGGCTG-3'. Como se describió previamente, en este caso también se verificó que las eficiencias de amplificación del gen normalizador y del gen problema fuesen cercanas al 100% y similares entre sí. Como control negativo se usó ADNc de la cepa STM23 cultivada bajo las mismas condiciones (sin ampicilina), el cual no rindió producto de amplificación con los cebadores para *bla*<sub>CMY-2</sub>.

#### 6.15 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta tesis fue realizado mediante el paquete informático SPSS 17.0 para Windows (IBM SPSS statistics). Las comparaciones de las medias de valores obtenidos para cada cepa usada en los ensayos de movilidad, crecimiento e invasividad, se hicieron mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA), usando la corrección de Bonferroni como test *post hoc*. El estudio de la homogeneidad de varianzas se realizó mediante el test de Levene. Teniendo en cuenta la heterocedasticidad en los resultados y la sensibilidad del ANOVA a la misma, se aplicó el análisis de varianza de Welch (Welch B, 1951) tomando  $\alpha=0.05$  como nivel de significancia. Adicionalmente se empleó el programa EXCEL 2003 (Microsoft ® Office Excel 2003 SP3) para la generación de los gráficos.

## 7. RESULTADOS

Para llevar a cabo los objetivos planteados se dividió al trabajo en dos grandes partes:

- I) Preparación de las construcciones genéticas con los genes de interés y la transformación de la cepa de *S. Typhimurium* usada en este estudio. Para ello se crearon construcciones genéticas usando dos “armazones” genéticos distintos: por lado un vector de expresión, con un promotor inducible (de modo de poder contar con una expresión regulable de dichos genes); por otra parte, un plásmido “natural” obtenido a partir de un aislamiento de *Salmonella* Derby de origen animal (para obtener una expresión constitutiva leve). Posteriormente, nos centramos en analizar el comportamiento de las cepas resultantes bajo diferentes condiciones *in vitro* para determinar si existía o no un costo biológico asociado a la síntesis de las  $\beta$ -lactamasas B o D.
- II) Análisis *in vitro* de alteraciones en el *fitness* de los aislamientos clínicos vinculado a la síntesis de  $\beta$ -lactamasas de clase C.

### **PARTE I**

#### **7.1 Efecto de la expresión inducible de $bla_{VIM-2}$ y $bla_{OXA-66}$ en el *fitness* de *S. Typhimurium* SL1344.**

Se obtuvieron las construcciones con los genes  $bla_{VIM-2}$  y  $bla_{OXA-66}$  clonados en pBAD22 bajo control del promotor inducible por arabinosa  $P_{BAD}$  como se describió en la sección Materiales y Métodos. Posteriormente se inactivó el gen *bla* endógeno del pBAD22 para evitar interferencias entre las dos  $\beta$ -lactamasas presentes en las construcciones resultantes. La verificación de la inducción de  $bla_{VIM-2}$  y  $bla_{OXA-66}$  en presencia de arabinosa, se realizó mediante evaluación del perfil de resistencia de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 transformada con las distintas construcciones y crecida en presencia/ausencia de inductor. Posteriormente, se realizó también un análisis de SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie de extractos totales proteicos obtenidos a partir de las cepas crecidas en presencia/ausencia de inductor. También se realizaron análisis de qRT-PCR para cuantificar los niveles de mRNA de ambos genes en las correspondientes cepas crecidas en presencia/ausencia de inductor.

Finalmente, se realizaron los estudios de costo biológico asociado a la expresión de ambos genes mediante la evaluación de distintas características fenotípicas: aspecto macro y microscópico de las cepas, velocidad de crecimiento, movilidad, y capacidad de invadir células epiteliales humanas en cultivo. En los ensayos fenotípicos se utilizó una concentración de inductor no demasiado elevada (0,05%) para evitar saturar la maquinaria de síntesis proteica.

### 7.1.1 Perfil de resistencia.

Para evaluar el perfil de resistencia se realizó la lectura de los halos de inhibición de crecimiento en los distintos antibiogramas luego de 18hs de incubación. Las cepas resultantes mostraron, al ser inducidas, un fenotipo de resistencia acorde a los genes clonados en tales plásmidos (Tabla 8). En tal sentido, la cepa LVR44 mostró únicamente resistencia a kanamicina; por otro lado las cepas LVR45 y LVR46 mostraron además distintos niveles de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, en función de los parámetros cinéticos intrínsecos a cada  $\beta$ -lactamasa. Así, OXA-66 confirió únicamente resistencia a ampicilina y cefalotina (una cefalosporina de primera generación); estos resultados concuerdan con el perfil descrito por Brown y cols., respecto a este tipo de enzimas, es decir predominantemente penicilinasas sin actividad cefalosporinasa (a excepción de cefaloridina ó cefalotina), y con hidrólisis lenta de imipenem (Brown *et al.*, 2004). Por otra parte, la producción de VIM-2 además de conferir resistencia a ampicilina y cefalotina, mostró actividad frente a los demás  $\beta$ -lactámicos ensayados en el antibiograma. Además, en el antibiograma de la cepa LVR46 inducida se observó un efecto sinérgico (dato no mostrado) entre los discos impregnados con EDTA y los discos de carbapenems (imipenem y meropenem). Este efecto sinérgico corresponde a la inactivación de la metalo- $\beta$ -lactamasa por el agente quelante de cationes divalentes (Walsh *et al.*, 2005), como se describió en la introducción.

Tabla 8. Antibiogramas de las cepas transformadas con las construcciones en pBAD22::kan sin inducir e inducidas con 0,05% Ara, respectivamente.

| S/Ara  | Amp | Kf | Ctx | Caz | Imp | Mem | 0,05% Ara | Amp | Kf | Ctx | Caz | Imp | Mem |
|--------|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| SL1344 | 20  | 23 | 33  | 30  | 32  | 31  |           | 19  | 21 | 34  | 29  | 32  | 29  |
| LVR44  | 21  | 23 | 31  | 28  | 31  | 30  |           | 20  | 22 | 32  | 28  | 30  | 29  |
| LVR45  | 21  | 22 | 33  | 29  | 28  | 30  |           | 6   | 6  | 33  | 28  | 27  | 29  |
| LVR46  | 20  | 22 | 30  | 26  | 26  | 27  |           | 6   | 6  | 21  | 23  | 20  | 24  |

Ara: L-arabinosa; Amp: Ampicilina; Kf: cefalotina; Ctx: Cefotaxime; Caz: Ceftazidime; Imp: Imipenem; Mem: Meropenem. Las medidas de los halos de inhibición se expresan en milímetros.

### 7.1.2 Análisis de la producción de VIM-2 y OXA-66 mediante SDS-PAGE.

El estudio del perfil proteico de los distintos extractos crudos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida mostró un incremento en la intensidad de una banda con un tamaño aproximado a 28 kDa, compatible con la metalo  $\beta$ -lactamasa VIM-2 (peso molecular teórico: 28,3 kDa), en el extracto correspondiente a la cepa LVR46 inducida respecto a la no inducida. Este incremento no se observa en el extracto de la cepa LVR44 (Fig. 10).

En el carril correspondiente al extracto de la cepa LVR45 inducida, no se aprecia la aparición o el aumento en intensidad de una banda compatible con el tamaño predicho para OXA-66 (peso molecular teórico: 30,6 kDA).

Esto indicaría o bien que en presencia del inductor dicha enzima no se está produciendo o que se produciría muy poco (no distinguible del perfil sin inducción).

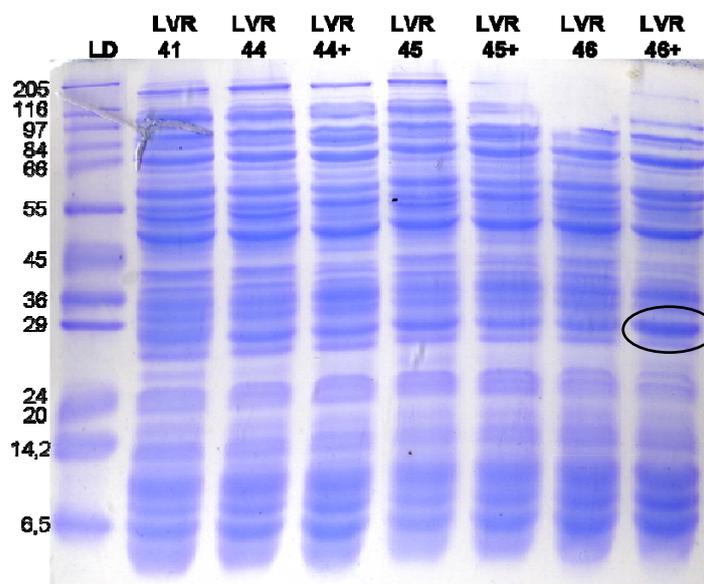


Figura 10. Coloración con azul de Coomassie de la corrida electroforética en poliacrilamida 15% de los extractos proteicos de *S. Typhimurium* transformada con las distintas construcciones genéticas en ausencia y en presencia de 0,2% de L-arabinosa. Carril 1: marcador de peso molecular (Sigma Wide Molecular Weight Range); Carril 2: cepa LVR41; Carril 3: cepa LRV44; Carril 4: cepa LVR44 inducida; Carril 5: cepa LVR45; Carril 6: cepa LVR45 inducida; Carril 7: cepa LVR46; Carril 7: cepa LVR46 inducida. El óvalo negro indica la banda correspondiente a VIM-2.

### 7.1.3 Actividad enzimática de los extractos proteicos.

El estudio de la actividad  $\beta$ -lactamasa mediante el método iodométrico mostró por un lado que la inserción del gen *aph(3')* dentro de la secuencia del gen *bla* presente en el vector pBAD22 eliminó la actividad enzimática de la proteína codificada por el mismo; en tal sentido los extractos de *S. Typhimurium* transformada con pBAD22::kan (cepa LVR44) crecida tanto en presencia como ausencia de inductor fueron incapaces de hidrolizar la ampicilina presente en la placa de agar-almidón, mientras que la cepa transformada con el vector sin modificar mostró actividad a los pocos minutos.

Por otra parte el extracto crudo de la cepa LVR46 en presencia de inductor mostró una muy buena actividad  $\beta$ -lactamasa ya que produjo un halo de hidrólisis visible a partir de los 30 segundos, aproximadamente, de comenzado el ensayo. El extracto crudo de la cepa LVR45 en presencia de inductor también mostró actividad enzimática aunque bastante más lentamente que los otros extractos (Fig. 11). Al momento de finalizado el ensayo (unos 30 minutos luego de sembrada la placa) los extractos crudos correspondientes a las cepas LVR45 y LVR46 en ausencia de arabinosa también comenzaban a mostrar un halo de hidrólisis de ampicilina, debido a la expresión residual del promotor  $P_{BAD}$  aún en ausencia del inductor. Estos resultados indican, por un lado inducción de la producción de OXA-66 y VIM-2 por efecto del agregado de L-arabinosa, y que VIM-2 se estaría produciendo en mayores niveles.

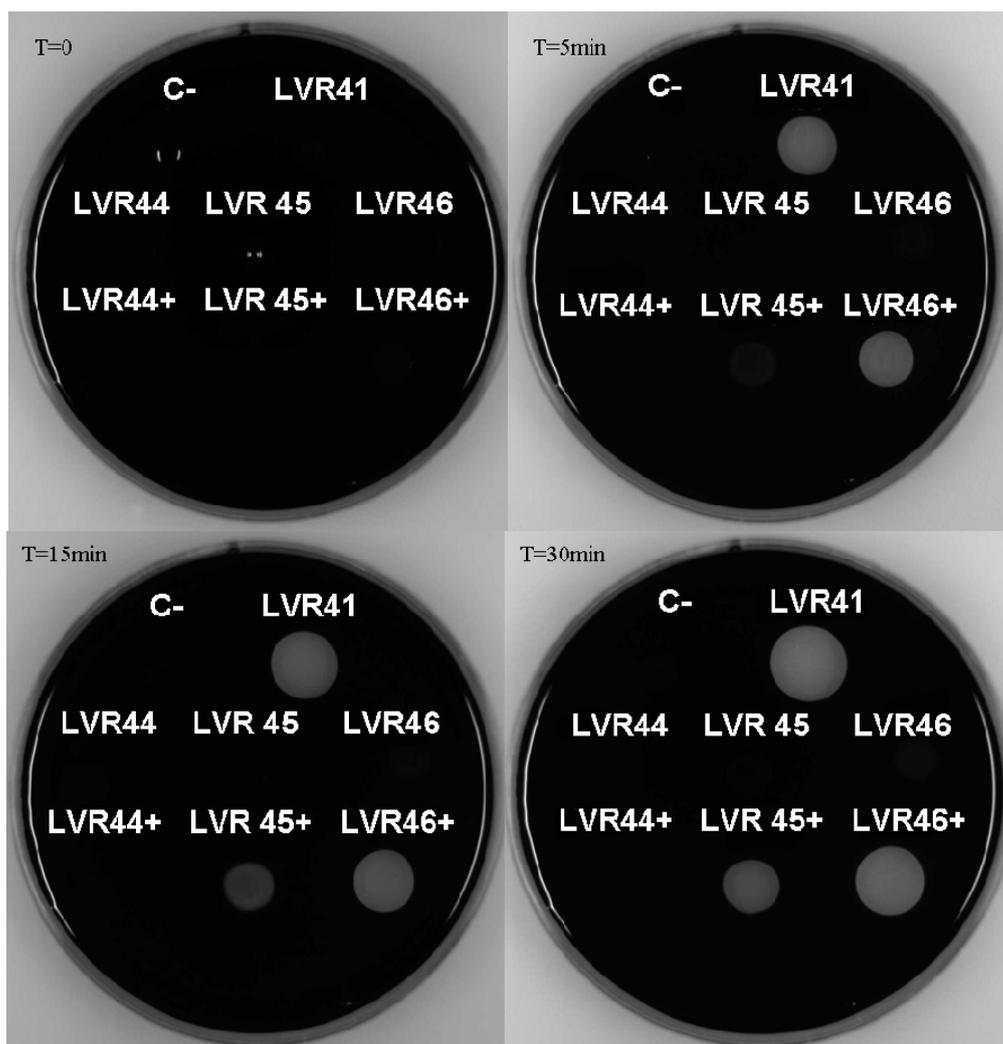


Figura 11. Ensayo de actividad enzimática mediante método iodométrico; se tomaron imágenes cada 10 segundos hasta  $t=15$  minutos, y posteriormente se capturó otra imagen a los 30 minutos de comenzado el ensayo. Se sembraron  $25 \mu\text{g}$  de proteínas de cada extracto crudo. Como control negativo (C-) se utilizó el mismo *buffer* en el que se prepararon dichos extractos. El símbolo + corresponde a los extractos de la cepas crecidas en presencia de 0,2% L-Arabinosa.

#### 7.1.4 Determinación de la síntesis de $\beta$ -lactamasas mediante real-time PCR.

Dado que los extractos crudos de las cepas inducidas demostraron tener niveles aparentemente mayores de VIM-2 que de OXA-66, decidimos verificar, de manera indirecta, la síntesis de ambas enzimas mediante la técnica de real-time PCR cuantitativa. Esta técnica nos permitió medir los niveles de mRNA para dichos genes en las cepas LVR42 y LVR43 en presencia o ausencia de inductor. En primera instancia se evaluaron dos genes *housekeeping* como controles endógenos, *icdA* y rADN 16S, contra los cuales normalizar la cantidad de mensajero de los genes de interés. El primero mostró variaciones en su nivel de expresión entre las condiciones de inducción y no inducción por lo que inicialmente se optó por el gen para el rARN 16S como control endógeno.

Previo a aplicar el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  se comprobó que la PCR tanto para el control endógeno como para los genes blanco tuvieran eficiencias relativamente similares; para ello se realizó un ensayo de PCR en tiempo real del control endógeno y de los genes blanco usando como molde diluciones seriadas del cADN, con los mismos cebadores y parámetros descritos en la sección materiales y métodos. Se graficó la diferencia en el ciclo umbral ( $C_T$ ) entre el control endógeno y los genes blanco en función de la dilución del cADN, y se trazó una curva de regresión lineal con los valores obtenidos (Fig. 12).

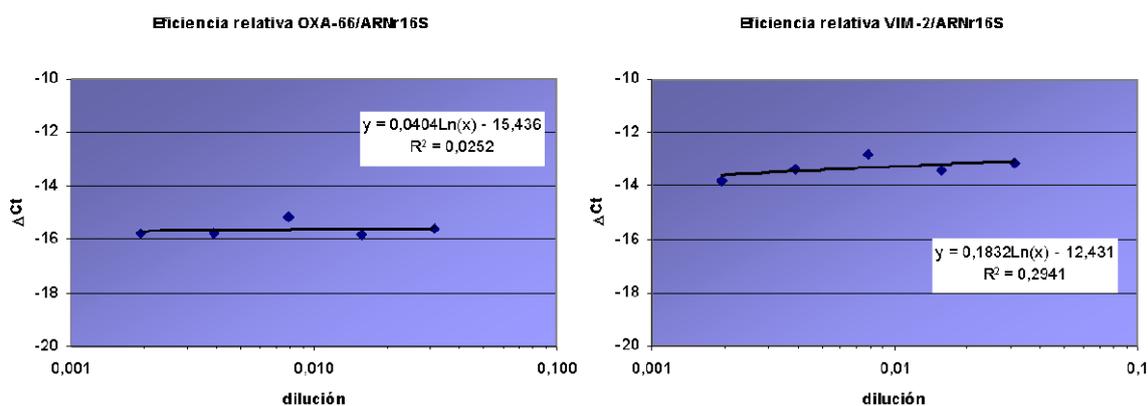


Figura 12. Cálculo de las eficiencias relativas entre los cebadores del control endógeno y de los genes problemas. Curvas de regresión lineal para la comparación de la eficiencia de la PCR con los cebadores para rARN 16S y  $bla_{VIM-2}$ , y rARN 16S y  $bla_{OXA-66}$ .

En todos los casos se realizó una curva de disociación (*melting curve*) para verificar la especificidad de los productos amplificados y descartar falsos valores de  $C_T$  por formación de dímeros de cebadores. Se cotejó además el tamaño de los amplicones obtenidos durante la real-time PCR mediante electroforesis en agarosa al 2% (p/v) en *buffer* TBE 0,5X. Los controles negativos (*S. Typhimurium* SL1344 *wild type* o la cepa LVR41) no rindieron producto de amplificación con los cebadores para  $bla_{OXA-66}$  o  $bla_{VIM-2}$ , o su amplificado se detectó al menos 30 ciclos más tarde que las cepas portadoras de las construcciones para  $bla_{OXA-66}$  o  $bla_{VIM-2}$ , como era de esperar.

Los resultados de la cuantificación relativa de  $bla_{OXA-66}$  y  $bla_{VIM-2}$  usando el gen 16S rARN como control endógeno (Fig. 13A y 13B) indican que los niveles de mRNA para  $bla_{OXA-66}$  y  $bla_{VIM-2}$  aumentan 576 y 788 veces, respectivamente en presencia de arabinosa en relación a los niveles observados en ausencia de inductor (Fig. 13B). Además, se observan mayores niveles de mRNA para VIM-2 que para OXA-66 tanto en condiciones de inducción con arabinosa como de no inducción (Fig. 13A).

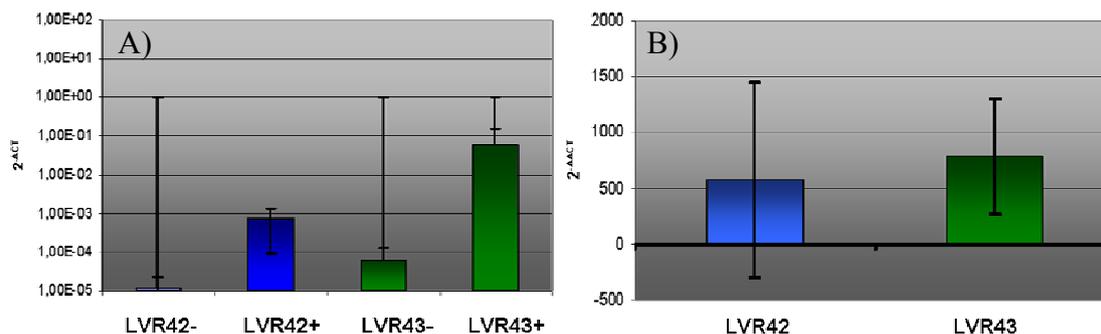


Figura 13. Gráficos correspondientes a los ensayos de cuantificación de los niveles de mRNA para los genes *bla*<sub>OXA-66</sub> (azul) y *bla*<sub>VIM-2</sub> (verde) en *S. Typhimurium* SL1344, usando el gen rARN 16S como control endógeno. En la gráfica A) se muestran los niveles absolutos de mRNA ( $2^{-\Delta CT}$ ) para *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en ausencia (-) y presencia (+) de L-arabinosa, expresando los datos en escala logarítmica. La gráfica B) muestra el *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), o el número de veces que aumenta el mRNA en condiciones de inducción relativo a la ausencia del mismo. Se grafican promedios y desvíos estándar de tres experimentos independientes.

Sin embargo, estos resultados muestran una gran variabilidad entre los distintos ensayos, por lo que se sospechó que podrían verse afectados por variaciones en el número de copias plasmídicas. Por lo tanto, se optó por usar el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> presente en el vector pBAD22 como control endógeno. Se diseñaron primers específicos para dicho gen y se verificó que la eficiencia de la PCR usando dichos primers fuese cercana al 100%, así como también que dicha eficiencia fuera similar a la de la PCR para los genes blanco (Fig 14).

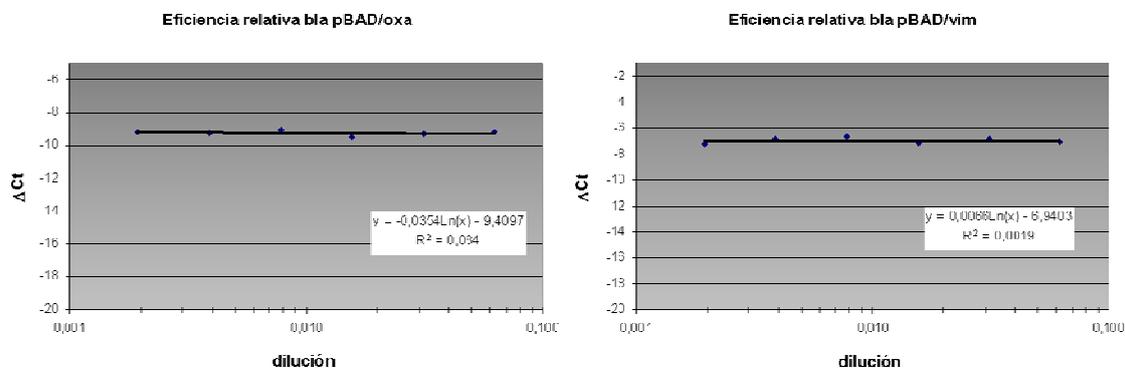


Figura 14. Curvas de regresión lineal para la determinación de las eficiencias relativas de qRT-PCR usando cebadores para el gen *bla*<sub>TEM-1</sub> presente en el vector pBAD22 como control endógeno y los genes *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub>.

Finalmente, mediante ensayos de real-time PCR se logró cuantificar de manera relativa los niveles de mensajero para OXA-66 y VIM-2 en las cepas LVR42 y LVR43, respectivamente, bajo condiciones de presencia del inductor, en relación a las mismas cepas en ausencia del mismo (Fig. 15A y 15B). De este modo, mediante la aplicación del método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , se logró determinar que en presencia de inductor los niveles de mRNA para *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> aumentan 310 y 520 veces, respectivamente en relación a la ausencia de L-arabinosa (Fig. 15B). Se deduce además, que en condiciones de

inducción los niveles absolutos de mRNA para VIM-2 son aproximadamente 10 veces mayores que los de OXA-66.

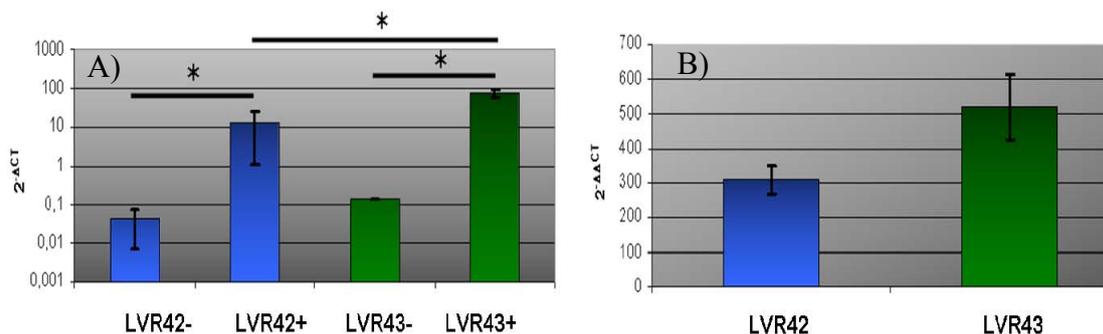


Figura 15) Gráficos correspondientes a los ensayos de cuantificación relativa de los niveles de mRNA para los genes *bla*<sub>OXA-66</sub> (azul) y *bla*<sub>VIM-2</sub> (verde) en las cepas LVR42 y LVR43, respectivamente, usando el gen *bla* pBAD (*bla*<sub>TEM-1</sub>) como control endógeno. Al igual que en la figura 13, se muestran los niveles absolutos de mRNA ( $2^{-\Delta CT}$ ) para *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en ausencia (-) y presencia (+) de L-arabinosa (A) y el *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) (B). En el gráfico (A) los datos se expresan en escala logarítmica, y los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa de mRNA entre el estado inducido y no inducido, y entre los niveles absolutos de mRNA para *bla*<sub>OXA-66</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>. En ambos casos, se grafican los promedios y los desvíos estándar de tres experimentos independientes.

#### 7.1.5 Efecto de la síntesis de $\beta$ -lactamasas en la morfología macroscópica.

*S. Typhimurium* SL1344 WT no mostró alteraciones en su morfología colonial tanto cuando fue cultivada en medios sin arabinosa como con arabinosa. La cepa LVR41 desarrolló colonias de igual aspecto independientemente de la presencia o ausencia del inductor; del mismo modo, no se observaron alteraciones en la morfología colonial de la cepa LVR42 aún en presencia del inductor (Fig 16A).

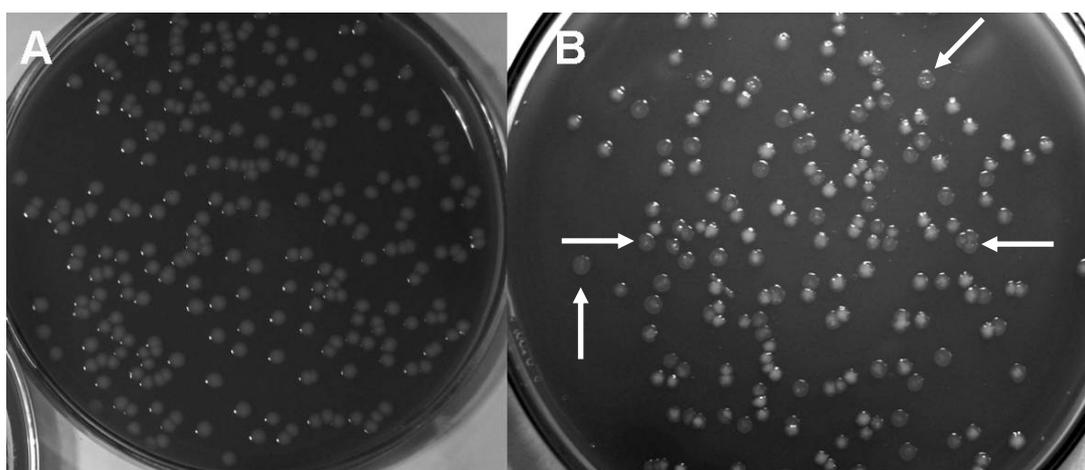


Figura 16. A) Morfología colonial normal de *S. Typhimurium* WT (también observada en las cepas LVR41 y LVR42) y B) Morfología macroscópica de la cepa LVR43, luego de 18 horas de incubación en agar sangre suplementado con 0,05% Ara y ampicilina (100 $\mu$ g/ml). Las flechas muestran algunas de las colonias con alteraciones en su morfología.

Por otra parte, la cepa LVR43 en presencia de 0,05% de arabinosa desarrolló dos tipos de morfología macroscópica, aquellas de aspecto similar a la cepa salvaje

(convexas, bordes netos y blancuzcas) y colonias achatadas, de bordes irregulares y transparentes (Fig. 16B).

#### 7.1.5.1 Efecto de la síntesis de $\beta$ -lactamasas en la morfología celular.

Durante la realización de las curvas de crecimiento, se tomaron alícuotas de cada cepa en estudio a distintos tiempos durante la fase de crecimiento exponencial y a tiempo final para evaluar la presencia de alteraciones en la morfología microscópica mediante microscopía de contraste de fase. En dicho estudio se vió que la inducción de *bla<sub>VIM-2</sub>* en la cepa LVR46 daba lugar a células filamentosas, de aspecto lisado que aquellas cepas expresando *bla<sub>OXA</sub>* (LVR45), o los controles sin inserto (LVR44) y *S. Typhimurium* SL1344 WT, sugiriendo defectos en la división celular y una mayor susceptibilidad a la lisis osmótica de las primeras (Fig. 17).

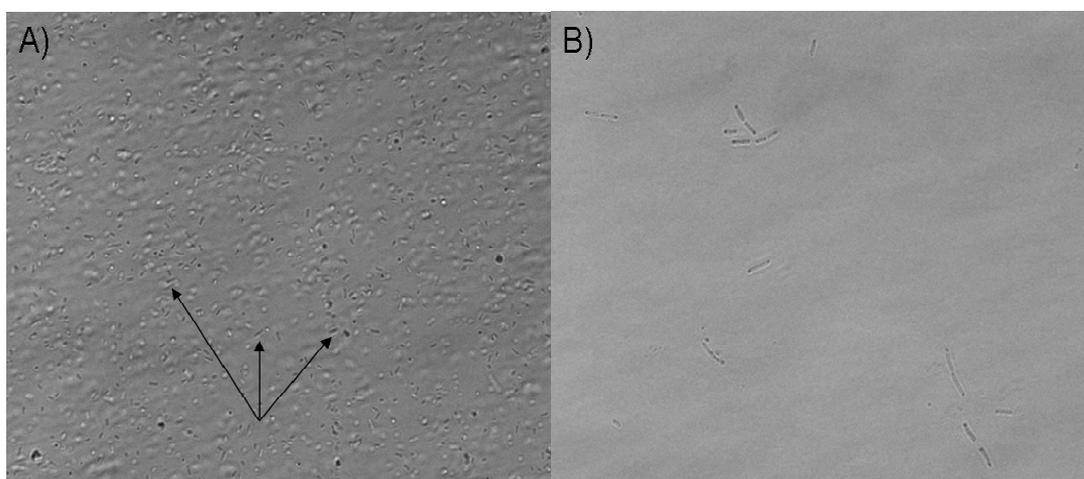


Figura 17. Efectos de la síntesis de la metalo  $\beta$ -lactamasa VIM-2 en la morfología celular de *S. Typhimurium* SL1344. En la figura A) se aprecia el aspecto habitual de dicho microorganismo en ausencia de inductor, bacilos cortos y de extremos redondeados (flechas negras). Por otra parte, en presencia de inductor (figura B) los bacilos se tornan filamentosos, de aspecto lisado y presentan zonas de opacidad en sus extremos.

#### 7.1.6 Efectos de la producción de VIM-2 u OXA-66 en la movilidad bacteriana.

Las curvas de movilidad para las cepas transformadas con las distintas construcciones se muestran en la figura 18.

Se desprende por un lado que el agregado de arabinosa al medio no altera la capacidad de movimiento de la cepa salvaje ni de la cepa LVR44. Si bien parecería existir una diferencia en la movilidad de *S. Typhimurium* SL1344 WT en presencia o ausencia de arabinosa, dicha diferencia no es estadísticamente significativa. En oposición a esto, la cepa LVR46 claramente mostró tener menor movilidad en presencia de inductor. Esto sugiere que la expresión inducida de VIM-2 tendría un efecto negativo en la movilidad de *S. Typhimurium* (Fig. 18).

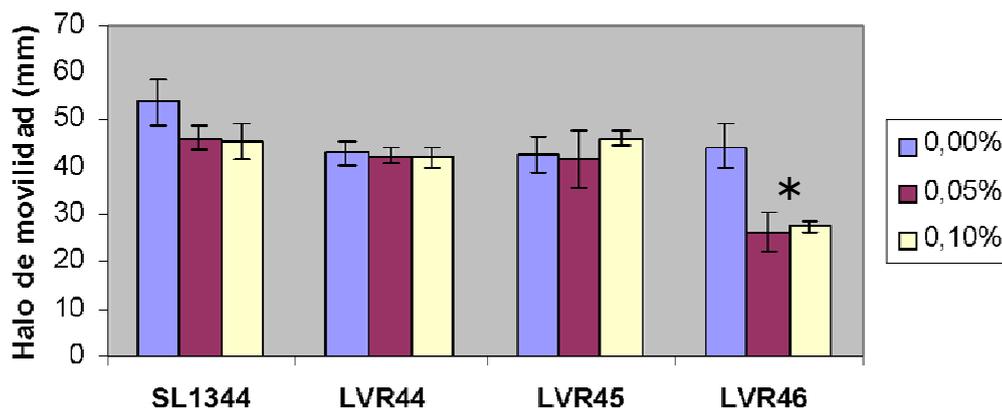


Figura 18. Gráfico de movilidad en agar al 0,3% en función de distintas concentraciones de L-arabinosa. Se comparan los halos de movilidad (en milímetros) a las 6 horas de comenzado el ensayo para *S. Typhimurium* SL1344 WT, y las cepas LVR44, LVR45 Y LVR46. Se graficaron las medias y los desvíos de tres ensayos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa para la cepa LVR46 y las demás cepas. En el recuadro se muestra las distintas concentraciones de L-arabinosa.

### 7.1.7 Efecto de la expresión de VIM-2 y OXA-66 sobre la cinética de crecimiento de *S. Typhimurium* SL1344.

Para evaluar si la síntesis de las  $\beta$ -lactamasas OXA-66 y VIM-2 afectaba el *fitness* de *S. Typhimurium* en términos de velocidad de crecimiento, se realizaron curvas midiendo la  $OD_{600}$  de cultivos en medio líquido a intervalos regulares (figura 19).

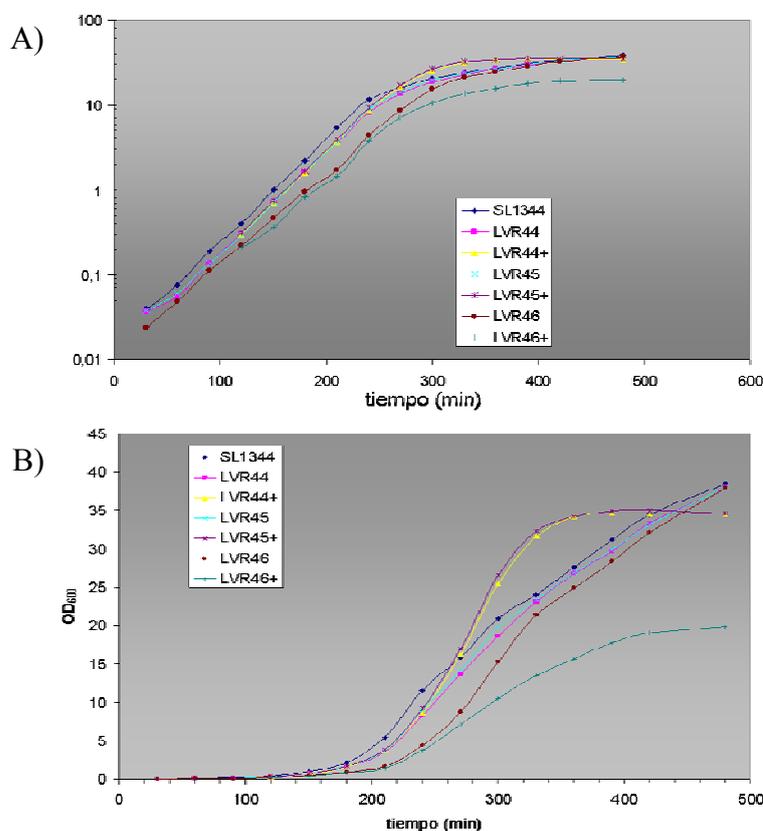


Figura 19. Curvas de crecimiento para *S. Typhimurium* transformada con las distintas construcciones genéticas, en presencia y ausencia del inductor. El gráfico A) está en escala logarítmica y se logra apreciar una pendiente ligeramente menor para la cepa que porta el gen *bla*<sub>VIM-2</sub>. En el panel B) se muestran los datos de la misma curva pero en escala lineal. En la misma se aprecia que en presencia de inductor la cepa LVR46 alcanza un estado estacionario a una  $OD_{600}$  mucho menor. Los valores de  $OD_{600}$  están corregidos por los distintos factores de dilución. En ambas instancias se muestra una curva representativa de tres ensayos independientes. En ambos gráficos el símbolo (+) indica la presencia de inductor.

Por una parte se vio que tanto la cepa control como las transformadas con el pBAD22:kan y pLO5::kan, mostraron tiempos de duplicación similares entre sí tanto en presencia como en ausencia de arabinosa (SL1344 =  $25,7 \pm 0,6$  min; LVR44 =  $26,2 \pm 1,7$  min; LVR44+ =  $25,8 \pm 1,2$  min; LVR45 =  $26,4 \pm 1,3$  min; LVR45+ =  $25,9 \pm 1$  min). La cepa LVR46, por otra parte, mostró un tiempo de duplicación mayor al resto, aumentando ligeramente en presencia del inductor (LVR46 =  $28,5 \pm 0,6$  min; LVR46+ =  $29,5 \pm 0,2$  min). A pesar de que las diferencias en los tiempos de duplicación no parecen ser estadísticamente significativas, en los distintos ensayos se observó que en presencia del inductor, la cepa LVR46 alcanzaba una fase estacionaria a una OD<sub>600</sub> menor que el resto de las cepas. Sin embargo en ausencia de arabinosa, la cepa LVR46 mostró un comportamiento similar al de las otras cepas.

#### 7.1.8 Efectos de la expresión de VIM-2 y OXA-66 en la invasividad de *S. Typhimurium* SL1344.

Uno de los parámetros comúnmente evaluados en los estudios de *fitness* en *Salmonella* es la capacidad de internalizarse en monocapas celulares (Morosini *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2004; O'Regan *et al.*, 2010), dado que la misma es un determinante esencial para la virulencia de esta bacteria. En tal sentido, se realizaron ensayos de invasividad en la línea celular Caco-2, con las cepas LVR43 y LVR42 inducidas y sin inducir; como control se incluyó la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT y la cepa LVR41 (Fig. 20). Previamente, se comprobó que *S. Typhimurium* SL1344 WT o transformada con las distintas construcciones genéticas no se veían afectadas por el medio de cultivo para células y que todas mostraban susceptibilidad frente a la gentamicina usada para la eliminación de bacterias extracelulares.

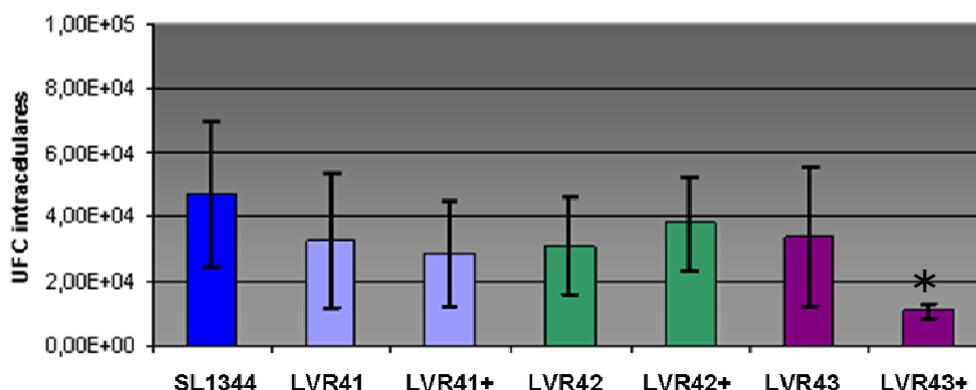


Figura 20. Ensayos de invasividad en Caco-2 de la cepa salvaje (SL1344) y transformada con las distintas construcciones, en ausencia y presencia de inductor (+). Los datos se presentan como número de UFC intracelulares, graficando la media y el desvío estándar de la media. El asterisco marca una diferencia estadísticamente significativa en la invasividad de la cepa LVR43 e inducida en relación a las otras cepas. Se muestran los promedios y desvíos estándar de tres ensayos independientes

La cepa LVR43 cultivada en condiciones de inducción mostró un nivel de invasividad significativamente inferior en relación tanto a la misma cepa sin inducir como a las demás, sugiriendo que la síntesis de la metalo- $\beta$ -lactamasa VIM-2 interfiere con la habilidad de *Salmonella* de inducir su propia internalización. Por otra parte, la inducción de la expresión de OXA-66 no afectó significativamente la capacidad de *S. Typhimurium* de invadir células Caco-2.

### 7.1.9 Efecto de la síntesis de OXA-66 y VIM-2 en la estabilidad plasmídica.

Como se mencionó anteriormente, el potencial costo biológico asociado a mecanismos plasmídicos de resistencia a antibióticos puede deberse a la propia función de resistencia, o estar ligado a la regulación del plásmido. Como estos elementos genéticos son transmitidos verticalmente durante la división celular podría esperarse que la selección natural (en ausencia de antibióticos), atenua el costo biológico o favorezca el surgimiento de bacterias que hayan perdido el plásmido (segregación). En este sentido las cepas LVR44, LVR45 y LVR46 fueron cultivadas durante unas 23 generaciones en ausencia de selección por antibióticos y posteriormente fueron sembradas en agar LB con y sin antibiótico para evaluar si, en ausencia de presión de selección, la expresión de OXA-66 ó VIM-2 alteraba la estabilidad plasmídica.

Como se muestra en la figura 21, tanto en presencia como en ausencia de inductor, los plásmidos pBAD22::kan y pLO5::kan son mantenidos de manera estable en sus respectivos hospedadores. Por el contrario, la inducción de la expresión de VIM-2, en ausencia de selección con antibióticos, se ve acompañada de una pérdida del plásmido en un 89% de la población bacteriana. Esto sugiere que la expresión de esta enzima es francamente desventajosa para *S. Typhimurium* en ausencia de presión de selección por antibióticos.

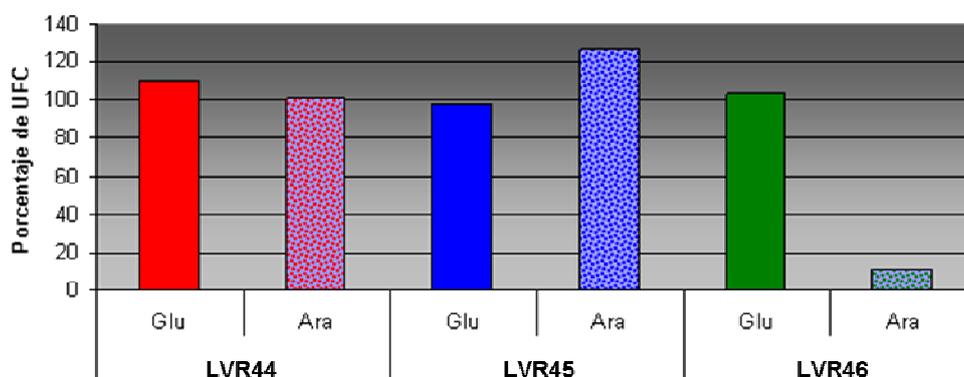


Figura 21. Ensayo de estabilidad plasmídica en ausencia de selección con antibiótico. Se muestra para cada cepa, el porcentaje de bacterias que retienen el plásmido (resistencia a kanamicina) en presencia y ausencia de inductor, luego de 23 generaciones de crecimiento en medio no selectivo. Los valores superiores al 100% serían atribuibles a variaciones en la técnica y no a factores biológicos

## 7.2 Efecto de la expresión constitutiva de *bla*<sub>VIM-2</sub> en el *fitness* bacteriano.

A pesar de que se realizaron múltiples intentos de clonar el gen *bla*<sub>OXA-66</sub> en el plásmido pST12, todos ellos fueron infructuosos, ya que las colonias obtenidas luego de la transformación en *E. coli* MC1061 portaban todas el plásmido original pST12 sin la incorporación del inserto.

Por otra parte, el cultivo de *S. Typhimurium* transformada con el plásmido pSTVIM en TSA-sangre ovina mostró alteraciones en la morfología colonial similares a las observadas en en el apartado 7.1.5; además, el examen al microscopio de cultivos líquidos en fase exponencial de la misma cepa mostró la presencia de células filamentadas (datos no mostrados).

### 7.2.1 Perfil de resistencia.

A diferencia de *S. Typhimurium* SL1344 WT, el antibiograma de la cepa LVR48 mostró una reducción en el diámetro de los halos de inhibición de penicilinas, cefalosporinas y carbapenems, lo que concuerda con el perfil hidrolítico de  $\beta$ -lactamasas de clase B (Tabla 9). Más aún, al igual que lo observado con la cepa LVR46, se pudo apreciar en el antibiograma un efecto sinérgico entre los discos conteniendo carbapenems y el disco impregnado con EDTA (dato no mostrado).

Tabla 9. Antibiograma de las cepas transformadas con las construcciones en pST12.

|        | Amp | Kf | Caz | Ctx | Imp | Mem |
|--------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| SL1344 | 20  | 16 | 20  | 25  | 25  | 27  |
| LVR47  | 6   | 8  | 8   | 21  | 28  | 28  |
| LVR48  | 6   | 6  | 6   | 6   | 16  | 15  |

Amp: Ampicilina; Kf: cefalotina; Ctx: Cefotaxime; Caz: Ceftazidime; Imp: Imipenem; Mem: Meropenem. Las medidas de los halos de se expresan en milímetros.

Por otro lado, las diferencias observadas entre los antibiogramas de las cepas LVR48 y LVR47 corresponden a que la  $\beta$ -lactamasa TEM-144 codificada por esta última, si bien es de espectro extendido, presenta un perfil marcadamente ceftazidimasa y carece de actividad carbapenemasa.

### 7.2.2 Estudios de qRT-PCR.

Por otra parte también se midió la producción constitutiva de VIM-2 en la cepa transformada con el plásmido pSTVIM (cepa LVR48), usando el método del  $2^{-\Delta CT}$ . Al carecer en este ensayo de la condición calibradora (la represión de *bla*<sub>VIM-2</sub>) se graficó

el valor  $2^{-\Delta CT}$  en lugar del *fold change* ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ); como controles negativos se usó cADN de *S. Typhimurium* SL1344 WT y la cepa LVR47, los cuales no rindieron amplificación con los primers para *bla*<sub>VIM-2</sub>, como era de esperar. El ensayo de PCR en tiempo real mostró la presencia de mRNA para *bla*<sub>VIM-2</sub> en la cepa LVR48 (Fig. 22), aunque en menores niveles que en la cepa LVR43. Esta diferencia se explica porque en el plásmido pSTVIM, *bla*<sub>VIM-2</sub> está bajo control del promotor P3, reportado por Goussard y cols. como un promotor débil (Goussard *et al.*, 1999).

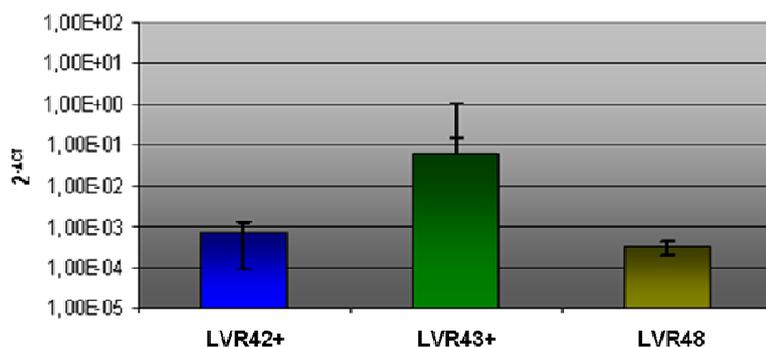


Figura 22. Cuantificación de niveles de mRNA de *bla*<sub>VIM-2</sub> de la cepa LVR48. Se muestra para su comparación, el  $2^{-\Delta CT}$  para el mRNA obtenido de las cepas LVR42 y LVR43 (+). Se grafica la media de tres ensayos independientes y sus respectivos desvíos estándar.

### 7.2.3 Ensayos de movilidad.

La expresión constitutiva de *bla*<sub>VIM-2</sub> en la cepa LVR48 también demostró ejercer un efecto negativo en la movilidad de *S. Typhimurium*; dicho efecto no sería atribuible a la presencia del plásmido, ya que la cepa LVR47 demostró tener el mismo nivel de movilidad que *S. Typhimurium* SL1344 WT (Fig. 23); esto sugiere que la expresión de *bla*<sub>VIM-2</sub> trae aparejado un mayor costo biológico que la expresión de *bla*<sub>TEM-144</sub>.

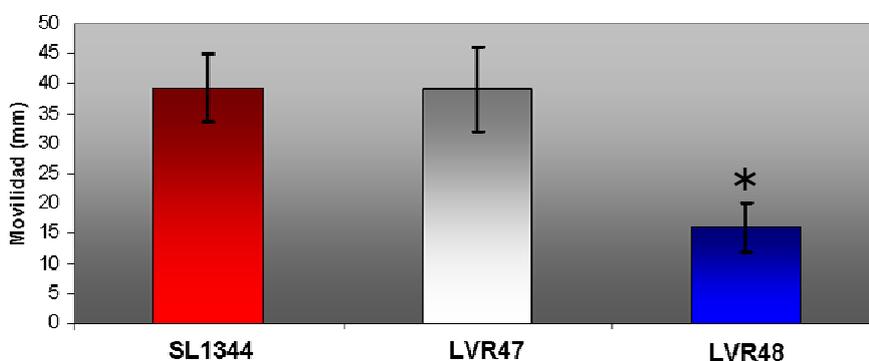


Figura 23 Gráfico comparativo de movilidad en agar 0,3% para *S. Typhimurium* SL1344 WT y las cepas LVR47 y LVR48, luego de 6 horas de incubación. Se graficó la media de tres ensayos independientes con sus respectivos desvíos estándar. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa en la movilidad de la cepa LVR48 con respecto a las otras cepas.

### 7.2.4 Cinética de crecimiento.

De manera similar a lo ocurrido con la cepa LVR46, la expresión constitutiva del gen *bla*<sub>VIM-2</sub>, clonado en un plásmido natural (pSTVIM), demostró afectar negativamente la capacidad de multiplicarse de *S. Typhimurium* SL1344 (cepa LVR48). Los valores de OD<sub>600</sub> obtenidos para esta cepa fueron significativamente menores a los registrados para *S. Typhimurium* SL1344 WT y para la cepa LVR47. Curiosamente, luego de unas cinco horas de incubación, la cepa transformada con pSTVIM mostraba un punto de inflexión en su curva de crecimiento, tal que a tiempo final dicha cepa presentaba valores de OD<sub>600</sub> similares a los de *S. Typhimurium* SL1344 WT, sugiriendo que el plásmido pSTVIM podría estar “perdiéndose” en la población bacteriana (Fig. 24).

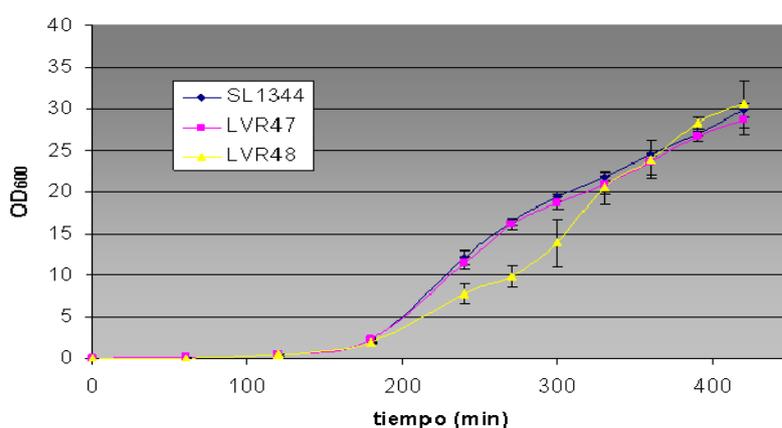


Figura 24. Curva de crecimiento para la cepa LVR48 (productora constitutiva de VIM-2), comparada con *S. Typhimurium* SL1344 WT y la cepa LVR47 (productora constitutiva de TEM-144). Los valores de OD<sub>600</sub> están ajustados por las diluciones. Se grafica el resultado de tres experimentos independientes.

### 7.2.5 Invasividad en células Caco-2.

Se determinó si la síntesis constitutiva de la  $\beta$ -lactamasa VIM-2 afecta la capacidad de *S. Typhimurium* de invadir la línea celular Caco-2. Como controles se incluyó la cepa *S. Typhimurium* SL1344 WT y su isogénica con el plásmido natural pST12 (LVR47). La cepa LVR48 mostró una reducción significativa en su capacidad de invadir la monocapa celular respecto a los controles; en términos comparativos dicha cepa fue un 70% menos invasiva que *S. Typhimurium* SL1344 WT (Fig. 25).

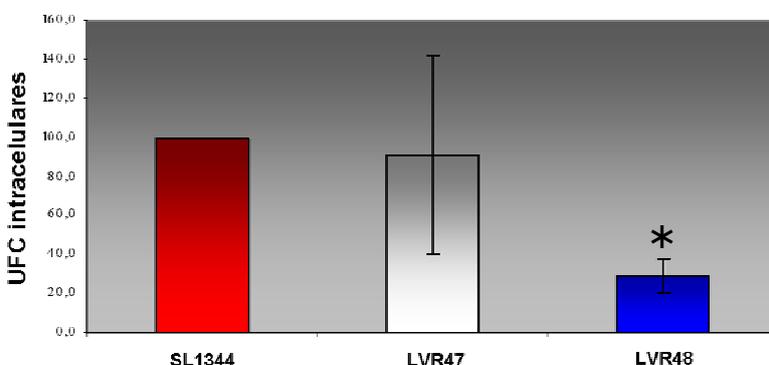


Figura 25. Ensayos de invasividad en Caco-2 para las cepas *S. Typhimurium* SL1344 WT, LVR47 y LVR48. Los datos se presentan como el número de UFC intracelulares recuperadas relativo a *S. Typhimurium* SL1344 WT. Se graficó la media de valores de tres ensayos independientes y el desvío estándar de la misma. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa entre el número de UFC intracelulares de la cepa LVR48 y los controles.

## **RESULTADOS PARTE II**

Los resultados parciales correspondientes a la segunda parte de la presente tesis fueron recientemente aprobados para su publicación en “Journal of Global Antimicrobial Resistance” (Elsevier, ISSN: 2213-7165) (Anexo IV).

### **7.3 Estudios de *fitness* en *Salmonella* productora de CMY-2.**

Los aislamientos clínicos de *S. Typhimurium* STM709 y STM910 fueron obtenidos a partir de niños con diarrea, internados en centros de cuidados terciarios en Montevideo en julio de 2009 y setiembre de 2010, respectivamente. Ambos aislamientos presentaron un perfil de resistencia compatible con la presencia de una enzima de tipo AmpC plasmídica. Por otro lado, la cepa STM23 usada como control corresponde a un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* identificado a partir de un caso de diarrea, pero a diferencia de las primeras, presentaba susceptibilidad a los  $\beta$ -lactámicos.

#### **7.3.1 Perfil de resistencia.**

Las cepas STM709 y STM910, así como sus respectivos transconjugantes, mostraron resistencia a cefalosporinas de tercera generación (cefotaxime y ceftazidime), cefamicinas (cefotixin) y combinaciones de aminopenicilinas con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico), siendo sensibles frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepime), carbapenems, quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina) y sulfonamidas (trimetoprima-sulfametoxazol). Por otra parte la cepa STM23 se mostró sensible frente a todos los antibióticos anteriormente mencionados (tabla 10).

Tabla 10. Perfil de sensibilidad de los aislamientos productores de CMY-2, de los respectivos transconjugantes y de la cepa receptora *E. coli* J53-2.

|                   | STM709 | STM910 | TcSTM709 | TcSTM910 | STM23  | J53-2 |
|-------------------|--------|--------|----------|----------|--------|-------|
| CIM ( $\mu$ g/ml) |        |        |          |          |        |       |
| CTX <sup>a</sup>  | 32     | 16     | 4        | 8        | 0,06   | 0,125 |
| CAZ <sup>b</sup>  | 48     | 32     | 16       | 16       | <0,016 | 0,038 |

<sup>a</sup> Cefotaxime; <sup>b</sup> Ceftazidime

#### **7.3.2 Caracterización de *bla*<sub>CMY-2</sub>.**

Tanto STM709 como STM910 generaron productos de amplificación de 426pb con los cebadores CITMF/CITMR. La secuenciación de dichos amplicones reveló la presencia de un gen del tipo *bla*<sub>CMY-2</sub>. Posteriores ensayos de PCR usando combinaciones de cebadores para secuencias de inserción y CITMF o CITMR, mostraron que *bla*<sub>CMY-2</sub> se

encontraba corriente debajo del elemento genético *ISEcp1*, resultado similar al de anteriores publicaciones (Mata *et al.*, 2012).

### 7.3.3 Estudio de plásmidos portadores de *bla*<sub>CMY-2</sub>.

Los transconjugantes obtenidos a partir de ambas cepas (designados TcSTM709 y TcSTM910) mostraron el mismo patrón de resistencia que las cepas donantes (tabla 9); el pasaje de *bla*<sub>CMY-2</sub> se confirmó mediante PCR. El análisis mediante tratamiento con nucleasa S1 y posterior PFGE mostró que las cepas donantes como los transconjugantes compartían un plásmido con un tamaño aproximado de 85 kb (Fig. 26). Los plásmidos portados por los aislamientos STM709 y STM910 se denominaron pSTM709 y pSTM910 respectivamente. Ambos plásmidos pertenecen al grupo de incompatibilidad IncI1 y presentaron, por PCR, un único sistema toxina-antitoxina, específicamente *pndAC*.

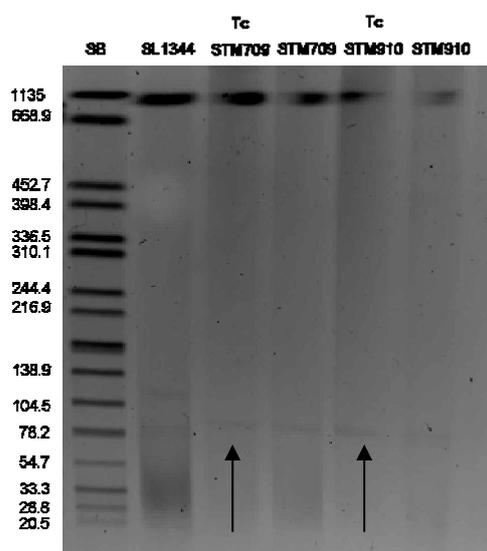


Figura 26. Tratamiento con nucleasa S1 y posterior electroforesis en campo pulsado. Las flechas indican los plásmidos pSTM709 y pSTM910 transferidos mediante conjugación. El tamaño de los plásmidos se estimó graficando la distancia de migración en papel semilogarítmico. SB: Cepa de referencia *Salmonella enterica* ser. Braenderup H9812 tratada con *Xba*I; el tamaño de las distintas bandas se expresa en kilobases. TcSTM709 y TcSTM910: transconjugantes de las cepas STM709 y STM910, respectivamente.

#### 7.3.3.1 Análisis de la secuencia nucleotídica del plásmido pSTM709.

El estudio de secuenciación de pSTM709 mostró que dicho plásmido posee un tamaño de 99184pb (Fig. 27). El mismo presenta un 99% de identidad nucleotídica con respecto a pCVM29188\_101, un plásmido de 101Kb obtenido de un aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Kentucky de origen aviar (Fricke *et al.*, 2009), pero a diferencia de este último carece de la secuencia de inserción IS66. El análisis preliminar de pSTM709 muestra que dicho plásmido posee aproximadamente 96 secuencias codificantes. La anotación parcial de las secuencias codificantes presentes en pSTM709 se muestra en el Anexo II.

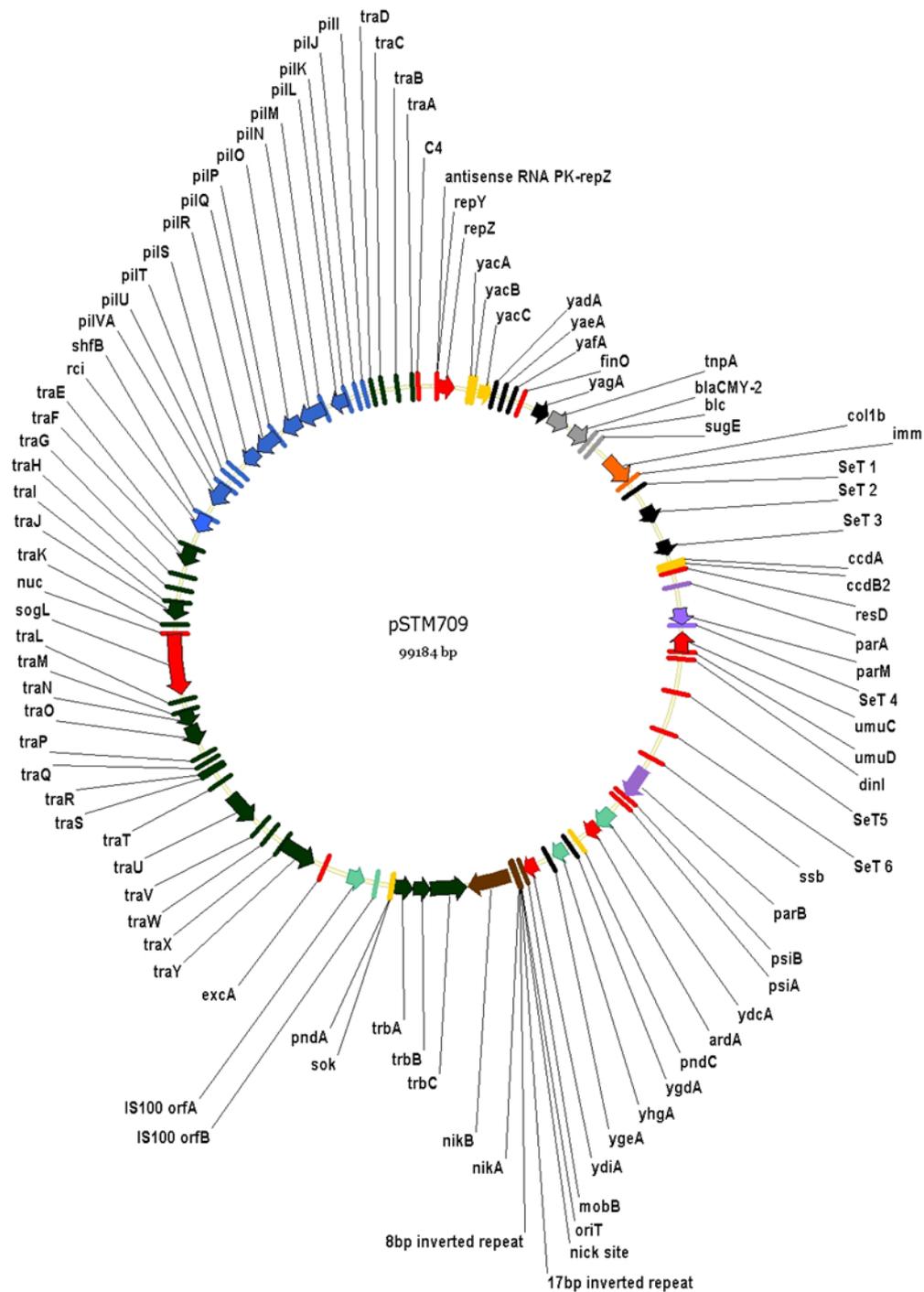


Figura 27. Representación circular del plásmido pSTM709. Se muestran todas las secuencias codificantes halladas, agrupadas en distintos colores según su función predicha: transferencia (verde oscuro); Pili de transferencia tipo IV (azul); bloque de resistencia (gris); sistemas de toxina-antitoxina (amarillo); proteínas hipotéticas (negro); partición (violeta); origen de transferencia (marrón); transposones (celeste); producción e inmunidad a la colicina (naranja) y misceláneos (rojo).

Topográficamente podemos dividir a pSTM709 en un bloque de genes para la transferencia por conjugación perteneciente a sistemas de secreción de tipo IV, además posee el operón *pil* encargado de codificar para el *pilus* de conjugación, y genes involucrados tanto en la partición de copias entre células hijas (*parABM*) como

en el mantenimiento del plásmido en la población (sistemas toxina-antitoxina); en este sentido, el monitoreo inicial por PCR indicó únicamente la presencia de los genes *pndAC*, sin embargo el análisis de la secuencia de pSTM709 mostró la existencia de otros sistemas de adicción como *ccdAB*, *yacABC* y curiosamente, solo el componente *sok* del sistema *hok/sok*.

El bloque de resistencia a los antibióticos está compuesto por el elemento transponible *ISEcp1-bla<sub>CMY-2</sub>-blc-sugE* que confiere resistencia a  $\beta$ -lactámicos de tercera generación y a compuestos de amonio cuaternario. Este módulo ha sido reportado previamente en diversas especies dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Su *et al.*, 2006), pudiendo tratarse de un evento de diseminación de un mismo plásmido o de dicho elemento transponible en distintos esqueletos genéticos.

#### 7.3.4 Tipificación molecular de STM709 y STM910.

Los estudios de tipificación molecular por MLST mostraron que las cepas STM709 y STM910 pertenecen al secuenciotipo 19 (perfil alélico: 10, 7, 12, 9, 5, 9, 2); por otra parte el estudio de campo pulsado indicó que ambas cepas diferían un 37% en su patrón de bandas (Fig. 28).

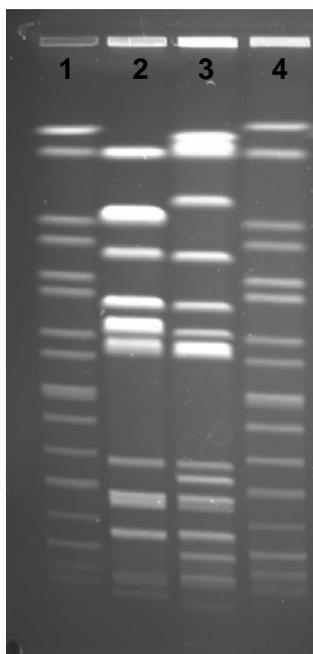


Figura 28. Electroforesis en campo pulsado de las cepas STM709 y STM910. Carriles 1 y 4: *S. Braenderup* H9812; carril 2: *S. Typhimurium* STM709; carril 3: *S. Typhimurium* STM910.

#### 7.3.5 Búsqueda de factores de virulencia.

La búsqueda de genes de virulencia arrojó resultados dispares entre las cepas STM709 y STM910; si bien ambas dieron resultados positivos para *avrA*, *gogB* y *shdA*, solo STM709 presentó el gen *sivH* a diferencia de STM910 que albergaba a los genes *spvC*, *pefA*, *sopE* y *sb41* (Tabla 11). La ausencia de *spvC* y *pefA* sugiere que la cepa

STM709 podría carecer del plásmido de virulencia de *S. Typhimurium* (Rychlik *et al.*, 2006).

Tabla 11. Genes de virulencia de los aislamientos productores de CMY-2 y de la cepa STM23

| Genes de virulencia | STM709 | STM910 | STM23 | Blanco                 |
|---------------------|--------|--------|-------|------------------------|
| <i>spvC</i>         | -      | +      | +     | Plásmido de virulencia |
| <i>pefA</i>         | -      | +      | nd    |                        |
| <i>avrA</i>         | +      | +      | +     | SPI-1                  |
| <i>sopE</i>         | -      | +      | -     | SopEΦ (SPI-1)          |
| <i>sivH</i>         | +      | -      | nd    |                        |
| <i>shdA</i>         | +      | +      | nd    | Isla genómica CS54     |
| <i>gogB</i>         | +      | +      | +     | Gifsy-1                |
| Sb41                | -      | +      | +     | φSE20                  |

nd: no determinado.

### 7.3.6 Estudios de movilidad.

La cepa STM709 mostró un nivel significativamente menor de movilidad en comparación con la cepa STM910 y las cepas de referencia SL1344 y STM23, reflejado por un halo de movilidad aproximadamente 80% más pequeño luego de 6 horas de incubación en agar semisólido (Fig. 29). Por microscopía de contraste de fase se observó que la cepa STM709 poseía un fenotipo autoagregativo (Fig. 30); dado que el mismo podría afectar la movilidad, previo a los ensayos de motilidad, la cepa STM709 fue centrifugada y cuidadosamente resuspendida con micropipeta para garantizar la disgregación de posibles agregados, confirmado por microscopía de contraste de fase. En este sentido, los resultados de movilidad fueron iguales con o sin disgregación previa.

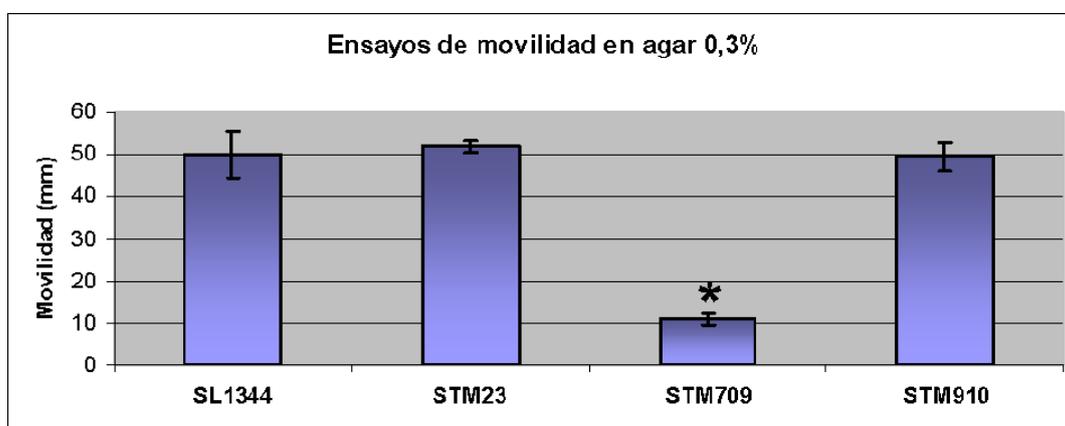


Figura 29. Resultado de los ensayos de movilidad para los aislamientos productores de CMY-2. Se graficó la media  $\pm$  el desvío estándar de tres ensayos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de movilidad obtenidos para STM709 y las demás cepas.

En relación a las curvas de crecimiento, no se constataron diferencias significativas entre las cepas STM709 y STM910 (datos no mostrados).

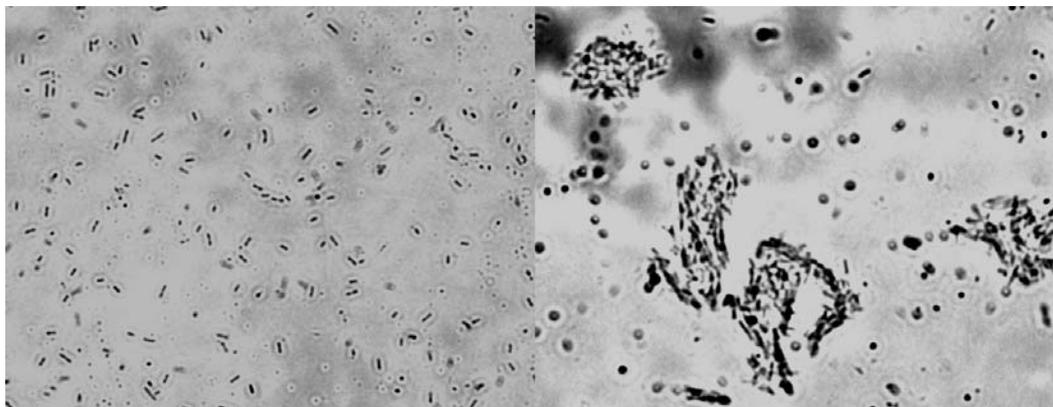


Figura 30. Microfotografía 400X de cultivos exponenciales en medios líquidos de la cepa control *S. Typhimurium* SL1344 (A), y de la cepa STM709 exhibiendo formación de los acúmulos celulares (B).

### 7.3.7 Estudios de Invasividad.

Los ensayos de invasividad en Caco-2 mostraron que la cepa STM709 fue significativamente menos invasiva que la cepa STM910 y las cepas de referencia SL1344 y STM23 (Fig. 31).

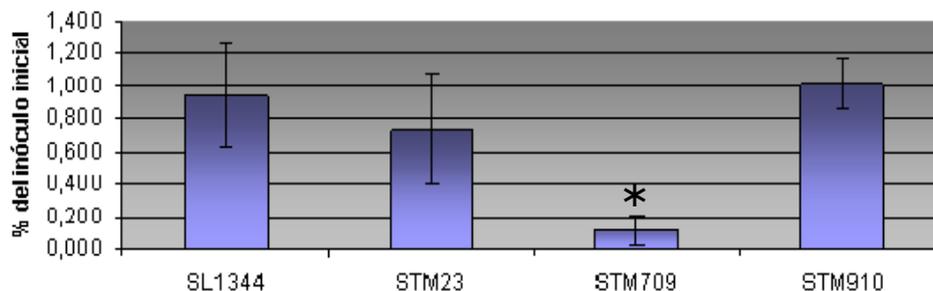


Figura 31. Ensayos de invasividad en Caco-2 para las cepas portadoras de *bla<sub>CMY-2</sub>* (STM709 y STM910) y los controles (SL1344 y STM23). Los resultados están expresados como porcentaje del inóculo inicial. Se graficó la media  $\pm$  el desvío estándar de dos ensayos independientes. El asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa entre la invasividad de STM709 y las demás cepas.

Para corroborar que la formación de acúmulos no interfería con la capacidad invasiva de STM709, el inóculo bacteriano fue centrifugado y resuspendido previo a la infección de la monocapa; la disgregación bacteriana se confirmó mediante microscopía de contraste de fase. No se encontraron diferencias de invasividad entre los inóculos de la cepa STM709 con o sin disgregación previa.

### 7.3.8 Análisis del LPS.

En virtud del fenotipo autoagregativo de la cepa STM709 se evaluó la morfología del LPS de los aislamientos en este estudio. El análisis del LPS en gel de poliacrilamida teñido con  $\text{AgNO}_3$  mostró que la cepa STM910 presentaba un perfil idéntico en comparación con SL1344 y STM23. Por el contrario, STM709 mostró únicamente bandas de bajo peso molecular, dato consistente con el fenotipo “rugoso” (Fig. 32).

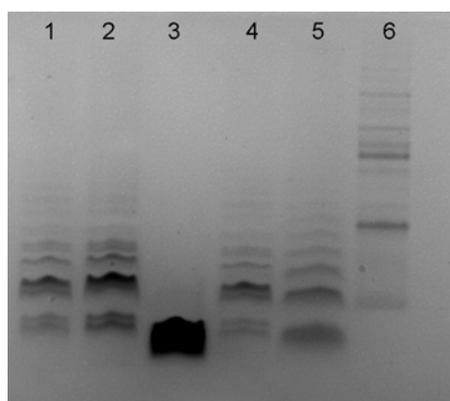


Figura 32. Perfil del LPS de las cepas productoras de CMY-2. 1: cepa de referencia SL1344; 2: cepa de referencia STM23; 3: *S. Typhimurium* STM709; 4: *S. Typhimurium* STM910; 5: LPS de *Salmonella* (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri); 6: marcador de peso molecular preteñido.

### 7.3.9 Estudios de qRT-PCR.

Como la cepa STM709 mostró tener niveles más bajos de movilidad e invasividad, pero niveles más elevados de CIM frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, en comparación a la cepa STM910, se evaluaron los niveles de expresión génica de  $bla_{\text{CMY-2}}$  de ambos aislamientos. En este sentido, el  $C_T$  obtenido para  $bla_{\text{CMY-2}}$  fue normalizado con el  $C_T$  obtenido para el gen *housekeeping icdA* en cada muestra, resultando en el  $\Delta C_T$  ( $\Delta C_T = C_{T_{\text{icdA}}} - C_{T_{\text{CMY-2}}}$ ). Luego se calculó y se graficó el valor  $2^{-\Delta C_T}$  para cada muestra. Teniendo en cuenta que para este ensayo no existía una condición de calibrado, se graficó el valor  $2^{-\Delta C_T}$  en lugar del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  usado comúnmente. El análisis de qRT-PCR reveló que los niveles de mRNA de  $bla_{\text{CMY-2}}$  eran unas 2.6 veces más bajos para STM910 en comparación con STM709 (Fig. 33), siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

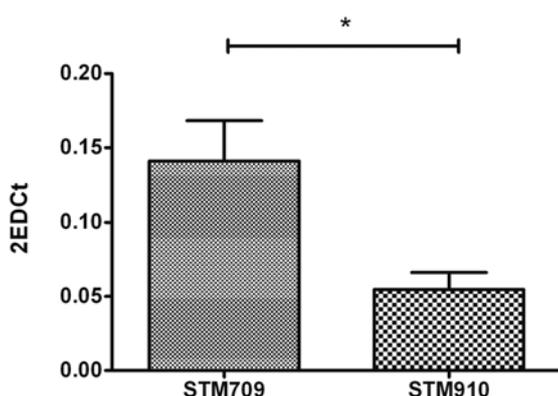


Figura 33. Cuantificación de niveles de mRNA de  $bla_{\text{CMY-2}}$ . El ARN total de STM709 y STM910 se obtuvo de cultivos en fase exponencial tardía, y los niveles de transcripto de  $bla_{\text{CMY-2}}$  se midieron mediante qRT-PCR. Se graficó la media  $\pm$  el desvío estándar de  $2^{-\Delta C_T}$  de 5 réplicas en dos ensayos independientes.

## 8. DISCUSIÓN

Trabajos previos han abordado el estudio del costo biológico que implica la expresión de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en enterobacterias. Morosini y cols. demostraron que la introducción de un plásmido portando el gen *ampC* de *Enterobacter cloacae* en una cepa de *S. Typhimurium* redujo su tasa de crecimiento en medios de cultivo y su invasividad en células MDCK. En el mismo estudio se vio también que cuando *ampC* es co-transferido con *ampR*, que codifica para un represor de la expresión de *ampC*, el costo biológico se ve aliviado, sugiriendo que la sobreexpresión de este gen es deletéreo para *Salmonella* (Morosini *et al.*, 2000). Por otra parte, otro grupo de trabajo reportó la reducción en el *fitness* de una cepa de *E. coli* transformada con un plásmido que codifica para SME-1, una  $\beta$ -lactamasa de clase A con actividad sobre carbapenems (Marciano *et al.*, 2007), el grupo de  $\beta$ -lactámicos con mayor espectro de actividad dentro de esta familia de antibióticos (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Más recientemente, en un trabajo publicado en el año 2012, el grupo de Fernández y cols. abordó el estudio del efecto de la expresión de  $\beta$ -lactamasas de clases A, B, C y D sobre la composición del peptidoglicano y el *fitness* de una cepa de laboratorio de *E. coli* no patógena (Fernández *et al.*, 2012). Estos autores concluyen que la expresión de OXA-24, OXA-tipo-10 y SFO-1 (pero no de TEM-1, TEM-29, CTX-M-32, CTX-M-8, CTX-M-2, CTX-M-14, VIM-1 ó FOX-4) genera cambios en la composición del peptidoglicano y afectan el *fitness* bacteriano.

Si bien otros grupos de trabajo han estudiado el costo biológico asociado a la expresión de  $\beta$ -lactamasas en *Salmonella*, particularmente para enzimas de tipo AmpC, esta tesis constituye el primer trabajo tendiente a evaluar las posibles alteraciones como resultado de la expresión de metalo- $\beta$ -lactamasas o de oxacilinasas en este importante patógeno.

El primer objetivo de la presente tesis de maestría consistió en evaluar el posible costo biológico de la expresión de  $\beta$ -lactamasas de clase B o D usando como modelo al microorganismo enteropatógeno *Salmonella enterica* serovar Typhimurim. Para ello se siguieron dos estrategias diferentes, por un lado la síntesis de tales enzimas a partir de un vector de expresión inducible y por otro la producción de las mismas usando como esqueleto genético un plásmido "natural" obtenido a partir de un aislamiento ambiental de *Salmonella enterica* serovar Derby. En este sentido, se logró clonar los genes *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>OXA-66</sub> en el vector de expresión pBAD22 y llevar a cabo las actividades planificadas en este trabajo. Por el contrario, los múltiples intentos de clonar *bla*<sub>OXA-66</sub>

en el plásmido natural pST12 resultaron infructuosos por lo que el efecto de la síntesis constitutiva de  $\beta$ -lactamasas solo pudo ser evaluada para VIM-2. Una posible explicación para la imposibilidad de obtener el plásmido pST12 portando el gen *bla*<sub>OXA-66</sub> en lugar de *bla*<sub>TEM-144</sub> es que el nivel de expresión de la primera o su actividad  $\beta$ -lactamasa fueran insuficientes para determinar el fenotipo de resistencia requerido para seleccionar los clones transformantes (selección que se hizo en presencia de ampicilina).

Por otra parte, si bien inicialmente no estaba contemplado en los objetivos de este proyecto, durante la fase experimental del mismo recibimos un par de aislamientos clínicos de *S. Typhimurium* portando una  $\beta$ -lactamasa de clase C (*bla*<sub>CMY-2</sub>) plasmídica; dichos aislamientos mostraron comportamientos dispares, uno demostró ser poco invasivo y tener poca movilidad mientras que el otro se comportaba de manera similar a las cepas usadas como control. De este modo, se decidió profundizar en la caracterización de los plásmidos portados por ambos aislamientos, en el estudio de la expresión de CMY-2 y del posible costo biológico impuesto por la misma.

### 8.1 Costo biológico de la expresión de VIM-2 y OXA-66.

Para estudiar el posible costo biológico asociado a la síntesis inducida de  $\beta$ -lactamasas de clase B y D, se clonaron los genes que codifican para las enzimas VIM-2 y OXA-66 en el vector pBAD22. Los genes insertados en este plásmido quedan bajo el control del promotor P<sub>BAD</sub> del operón arabinosa, por lo que la expresión del inserto se induce por el agregado de dicho azúcar.

Los estudios realizados tanto en medios inertes como en la línea celular Caco-2 mostraron una disminución significativa en el *fitness* de *S. Typhimurium* asociada a la inducción de la expresión de VIM-2. Esto se vio reflejado en una menor tasa de crecimiento, menor movilidad y menor invasividad que los controles (cepa WT y transformada con el vector sin inserto), además de alteraciones en la morfología celular. Si bien la propia presencia del plásmido podría ocasionarle un costo biológico a la bacteria portadora debido a las funciones de mantenimiento plasmídico, este no es el caso dado que la presencia del vector sin inserto o portando el gen *bla*<sub>OXA-66</sub> no trajo aparejados efectos negativos detectables sobre el *fitness* bacteriano, en comparación con la cepa de referencia. Asimismo, muchos de los estudios fenotípicos llevados a cabo en la presente tesis fueron realizados en ausencia de antibióticos  $\beta$ -lactámicos por lo que los efectos negativos observados sobre el *fitness* bacteriano no

se pueden adjudicar a efectos detrimentales de dichos antibióticos sobre la pared celular.

La producción de OXA-66 en *Salmonella* no se vio acompañada de alteraciones en los distintos parámetros registrados. Hay varias posibles explicaciones para los distintos efectos observados en *Salmonella* como consecuencia de la producción de VIM-2 u OXA-66, las cuales no son excluyentes entre sí. Por un lado, el análisis de SDS-PAGE de los extractos proteicos de cepas expresando una u otra  $\beta$ -lactamasa (Fig. 10), así como también los experimentos de cuantificación de los niveles del mRNA para ambos genes luego de la inducción con arabinosa (Fig. 13), indican que VIM-2 se está produciendo en mayor nivel que OXA-66. Una causa detrás de la diferente producción de ambas enzimas podría ser el sesgo en el uso de codones. La secuencia nucleotídica empleada por un organismo para codificar una proteína determinada a menudo difiere de la secuencia usada por otro organismo para codificar la misma proteína (Gustafsson *et al.*, 2004); los codones empleados para cada aminoácido pueden variar entre distintos microorganismos en función del repertorio de tARN, afectando la síntesis proteica en función de la disponibilidad de los distintos aminoacil-tARN, demorando o deteniendo la translocación del ribosoma en presencia de codones “raros” (Botzman *et al.*, 2011; Shabalina *et al.*, 2013). En este sentido, la mayor frecuencia de codones “raros” para *Salmonella* en  $bla_{OXA-66}$  en relación a  $bla_{VIM-2}$ , podría repercutir en mayores dificultades a la hora de traducir en proteínas la primera (Anexo III, Fig. A3.1).

Por otro lado, se estudió la actividad  $\beta$ -lactamasa de VIM-2 y OXA-66 en *S. Typhimurium* SL1344 mediante antibiograma por disco difusión y mediante método iodométrico a partir de extractos crudos de cepas inducidas versus no inducidas. En este sentido, en ausencia del inductor la cepa productora de VIM-2 mostró el mismo perfil de resistencia que los controles mientras que en presencia de arabinosa dicha cepa se mostró más resistente a las cefalosporinas de tercera generación, evidenciándose incluso la ampliación de los halos de inhibición de crecimiento por efecto sinérgico con EDTA (Tabla 7). Por el contrario, la cepa productora de OXA-66 en presencia de arabinosa, solo mostró resistencia a ampicilina y cefalotina, manteniendo el perfil de sensibilidad frente a cefalosporinas de tercera generación y carbapenems. El extracto proteico de dicha cepa mostró tener cierta actividad  $\beta$ -lactamasa, aunque mucho menor que la mostrada por el extracto de la cepa productora de VIM-2 (Fig. 11). El resultado del antibiograma y el del ensayo por método iodométrico para la cepa productora de OXA concuerdan con datos publicados previamente; en este sentido OXA-66 es una enzima con un perfil hidrolítico acotado,

incapaz de hidrolizar cefalosporinas y con propiedades cinéticas atípicas para el grupo al cual pertenece, es decir lenta hidrólisis de oxacilina, cloxacilina e imipenem (Brown *et al.*, 2005). Esta hidrólisis lenta se debería a una constante de Michaelis ( $K_m$ ) baja para dichos antibióticos, indicativo de una muy elevada afinidad de la enzima por el sustrato y por ende una baja tasa de recambio enzima-molécula de antibiótico. En virtud de lo anterior, se desconoce la contribución exacta de este tipo de  $\beta$ -lactamasas al fenotipo de resistencia (Poirel *et al.*, 2010).

Por otra parte, otros autores, en el marco de un trabajo con cepas de *A. baumannii*, han propuesto que si bien las enzimas derivadas de OXA-51/OXA-66 muestran una actividad carbapenemasa débil, la inserción corriente arriba de un promotor fuerte podrían, hiperproducción mediante, derivar en resistencia a carbapenems (Hu *et al.*, 2007). Los ensayos de qRT-PCR llevados a cabo en el presente trabajo mostraron que la expresión de OXA-66 aumentaba más de 300 veces en la cepa inducida en relación a la cepa sin inducir; a pesar de ello el antibiograma de la cepa productora de OXA-66 no mostró resistencia frente a imipenem o meropenem (tabla 7).

Todos estos resultados apuntan por tanto a que, en el modelo utilizado (*S. Typhimurium* como hospedador y pBAD22 como vector de expresión), la producción de VIM-2 es mayor que la de OXA-66, y a su vez, la actividad hidrolítica de la primera es más eficiente que la de la segunda, ambos factores que podrían contribuir al distinto costo biológico generado por la expresión de una u otra  $\beta$ -lactamasa. Sería interesante determinar si la actividad enzimática de VIM-2 cumple un rol en el efecto deletéreo observado, mediante el análisis del *fitness* de cepas expresando mutantes puntuales de esta enzima catalíticamente inactivos.

Nuestros resultados difieren con los datos obtenidos por Fernández y cols. (Fernández *et al.*, 2012). Como ya mencionamos, en dicho trabajo se evidenció que la expresión de las  $\beta$ -lactamasas OXA-10-like, OXA-24 y SFO-1 en *E. coli* generaba cambios en la composición del peptidoglicano y traía aparejado un costo biológico para dicho microorganismo. Este costo biológico se evidenció por un menor crecimiento de las cepas expresando OXA-10-like, OXA-24 y SFO-1 respecto a la cepa portando el vector vacío en ensayos de competición tanto en LB como en el modelo murino de infección intraperitoneal. Por otra parte, la expresión de VIM-1 no se vio acompañada de efectos deletéreos. Dejando de lado que el costo biológico fue evaluado tomando en cuenta distintos parámetros (p.ej. invasividad en células epiteliales, velocidad de crecimiento y movilidad en nuestro trabajo versus crecimiento en LB o en los órganos de un ratón en ensayos de competición frente a la cepa control en el trabajo de

Fernández y cols.), dos posibles razones podrían explicar las diferencias encontradas entre esta tesis y el trabajo mencionado:

- i) por un lado diferencias intrínsecas a los microorganismos elegidos como portadores (*S. Typhimurium* vs *E. coli*) y a los vectores y promotores a partir de los cuales se expresan los respectivos genes (el vector pBAD22 bajo control del promotor P<sub>BAD</sub> vs el vector pBGS18-pCT bajo control de un promotor de *bla*<sub>CTX-M</sub>). Es de notar que en el trabajo de Fernández y cols. no se realiza cuantificación de los niveles de expresión de las distintas enzimas, ni a nivel de mRNA ni de proteína.
- ii) por otra parte, las propiedades catalíticas inherentes a las distintas enzimas podrían de algún modo justificar las diferencias observadas. En este sentido, las enzimas OXA-10-like y OXA-24 pertenecen a subgrupos distintos al de OXA-66 (Poirel *et al.*, 2010). Más aún, el subgrupo OXA-10-like posee al menos 14 variantes con perfiles hidrolíticos variables por lo que sería interesante conocer la variante ensayada por Fernández y cols. En cuanto a las enzimas de tipo VIM, el análisis de las secuencias aminoacídicas deducidas mostró que VIM-1 y VIM-2 presentan aproximadamente un 90% de identidad (25 cambios); ocho de los cambios se dan en el péptido señal, tres en la cercanía del sitio activo y los restantes se ubican mayoritariamente en la superficie de la proteína (Anexo III, Fig. A3.2B). Estos cambios hacen que VIM-1 y VIM-2 presenten diferencias notorias en su interacción con distintos sustratos y también con quelantes de cationes divalentes; así, VIM-2 tiende a unirse con mayor afinidad que VIM-1 a la mayoría de los  $\beta$ -lactámicos (a excepción de imipenem), mientras que VIM-1 hidroliza dichos antibióticos de manera más eficiente (Docquier *et al.*, 2003).

El mecanismo responsable por la reducción en el *fitness* de *Salmonella* al expresar el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> no es claro (las alteraciones observadas no parecen ser atribuibles a una única causa), y probablemente obedezca a varios factores. A priori se podría adjudicar la caída en la tasa de replicación, movilidad y capacidad invasiva a la sobreproducción de VIM-2, por secuestro de la maquinaria de síntesis proteica. Sin embargo, estos efectos también se observaron cuando VIM-2 se expresó a partir del promotor natural P<sub>3</sub> (pSTVIM), que ya ha sido reportado como un promotor débil (Goussard *et al.*, 1999).

Por otra parte, la síntesis de proteínas extracelulares puede no resultar redituable para las bacterias ya que dichas proteínas tienen una baja probabilidad de ser recicladas;

por lo tanto, éstas tienden a contener un porcentaje mayor de aminoácidos energéticamente económicos en comparación con proteínas citoplasmáticas o de membrana celular\* (Smith *et al.*, 2010). Especulamos entonces, que la presencia o ausencia de costo biológico ligado a la síntesis de VIM-2 u OXA-66, respectivamente, podría estar dada por la diferencia en la composición aminoacídica de ambas enzimas, siendo la producción de VIM-2 energéticamente más desfavorable que la de OXA-66. Sin embargo, basado en los datos publicados por Craig y cols. (Craig *et al.*, 1998), el cálculo del número de moléculas de ATP necesarios para sintetizar una molécula de VIM-2 u OXA-66 no parece ser significativamente distinto, curiosamente es ligeramente mayor para OXA-66 (Anexo III, tabla A3.1).

Adicionalmente, Marciano y cols. encontraron que cepas de *E. coli* transformadas con un plásmido codificante de SME-1 (una carbapenemasa de clase A) sufrían lisis celular y rearrreglos plasmídicos. En virtud de la evidencia experimental los autores sugirieron que el péptido señal de SME-1 sería el responsable de la reducción del *fitness* bacteriano, actuando de manera similar al péptido señal de colicinas ya sea secuestrando componentes de la maquinaria de translocación de proteínas, o formando poros en la membrana celular. Como se mencionó anteriormente VIM-2 presenta ocho cambios aminoacídicos en su péptido señal con respecto a VIM-1, en este sentido resulta tentador hipotetizar que la causa (o una de las causas) responsable por la reducción en el *fitness* de *S. Typhimurium* sería la interacción del péptido señal de VIM-2 con la membrana citoplasmática o con proteínas del translocón. En este sentido sería interesante realizar construcciones híbridas de VIM-2 portando el péptido señal de una  $\beta$ -lactamasa “inocua” y viceversa para determinar qué papel juega el mismo en esta caída del *fitness*; de todos modos, el análisis *in silico* del péptido señal de VIM-2 y SME-1 muestra que los mismos son bastante disímiles tanto a nivel de secuencia como en las propiedades fisicoquímicas de sus residuos aminoacídicos (Anexo III, Figs. A3.3 y A3.4). De este modo, la pérdida de *fitness* de *S. Typhimurium* observada en la presente tesis no estaría ligada al péptido señal de VIM-2.

Siguiendo la misma línea de pensamiento, otra posible explicación para el efecto deletéreo asociado a la expresión de VIM-2 es el debilitamiento de la pared celular como resultado de la interferencia con proteínas encargadas del mantenimiento de dicha estructura. Se ha descrito en enterobacterias un complejo de proteínas

---

\* Se define el costo de sintetizar un aminoácido como el ATG/GTP usado en la biosíntesis y la energía invertida durante el consumo de los precursores.

denominado sistema Tol; dicho complejo está formado por tres proteínas de membrana interna (TolA, TolQ y TolR), una proteína periplásmica (TolB) y una lipoproteína de membrana externa denominada PAL (peptidoglycan-associated lipoprotein) (Rigal *et al.*, 1997). TolB se une a través de su extremo carboxi-terminal a PAL, esta interacción está acoplada a un gradiente transmembrana de protones y es necesaria para mantener la estabilidad de la membrana externa, fundamentalmente en los sitios de división (Papadakos *et al.*, 2012). Por otra parte estudios estructurales demostraron que el extremo carboxi-terminal de TolB presenta similitud con el sitio activo de las metalo- $\beta$ -lactamasas lo que sugiere una implicancia directa del sistema Tol-PAL en la biosíntesis del péptidoglicano (Abergel *et al.*, 1999). De esta manera, podría darse un fenómeno de inhibición competitiva en el espacio periplásmico de *S. Typhimurium*, en el cual el exceso de moléculas de VIM-2 (en un microorganismo normalmente no productor de estas enzimas) impediría o limitaría la interacción TolB-PAL. En este sentido, las alteraciones en la morfología macro y microscópica (filamentación y aspecto lisado) observadas en este trabajo en las cepas productoras de dicha metalo  $\beta$ -lactamasa apoyarían esta línea de pensamiento. Sería interesante diseñar estudios de co-localización que permitiesen confirmar si este tipo de eventos tienen lugar o no, además de analizar la susceptibilidad de *S. Typhimurium* expresando *bla*<sub>VIM-2</sub> a diferentes condiciones de estrés ambiental (osmótico, pH, entre otros).

En este trabajo se reporta que la producción de VIM-2 en *S. Typhimurium*, tanto a partir de un promotor fuerte e inducible como uno débil y constitutivo reduce la capacidad de la bacteria de internalizarse en células eucariotas. La filamentación bacteriana observada al microscopio de contraste de fases podría explicar en parte esta reducción en la capacidad de internalización. La invasión de células no fagocíticas por *Salmonella* es un evento altamente coordinado, en el que participan flagelos, fimbrias, la movilidad y el SSTT de SPI-1 (Misselwitz *et al.*, 2012). En este sentido, se ha reportado que mutantes de *Salmonella* carentes de movilidad muestran reducida invasividad en células epiteliales (Schmitt *et al.*, 2001; Yim *et al.*, 2011). La reducción en la movilidad observada en *S. Typhimurium* expresando VIM-2 podría por tanto también influir en la disminución de la invasividad observada.

Finalmente, el requerimiento de zinc como co-factor para la actividad enzimática de VIM-2 podría estar involucrado en el fenómeno de reducción del *fitness* observado. Basado en la secuencia del péptido señal (región amino terminal conteniendo residuos con carga positiva, región central hidrofóbica y extremo carboxi-terminal conteniendo

residuos con cadenas laterales pequeñas), VIM-2 sería transportada como preproteína al espacio periplásmico a través del sistema Sec, adquiriendo su conformación final en dicho sitio (Rusch *et al.*, 2007). El agregado de los átomos de zinc ocurre entonces en el periplasma y depende de la biodisponibilidad de este elemento, a punto tal que se ha demostrado experimentalmente que las metalo- $\beta$ -lactamasas pueden presentar otros cationes en su centro activo como hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ) o manganeso (Hu *et al.*, 2008), e incluso níquel (Valdez *et al.*, 2012). Por otra parte la concentración de zinc en el periplasma bacteriano está determinada por la cantidad de este metal presente en el entorno; de esta manera, frente a un suministro limitado de dicho elemento, podríamos plantear un escenario en el que la “pre-proteína” VIM-2 actuaría como quelante de cationes para adquirir su forma madura, recurriendo a otras fuentes de Zn u otros metales, aún a expensas de otras estructuras en el periplasma bacteriano. En este sentido, el género *Salmonella* presenta en dicho compartimento celular tres superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc (SodCI, SodCII y SodCIII) (Sansone *et al.*, 2002). Estas enzimas jugarían papeles complementarios en la protección frente a especies oxígeno reactivas; así SodCI facilitaría la supervivencia de *Salmonella* en el medio intracelular mientras que SodCII conferiría resistencia frente a estos radicales durante el crecimiento en medios extracelulares aerobios; Ammendola y cols. han reportado la pérdida de actividad de SodCII en ausencia de zinc (Ammendola *et al.*, 2008), apoyando en este sentido la hipótesis planteada anteriormente. Sería interesante realizar ensayos en medios suplementados con  $\text{Zn}^{2+}$  para determinar si existe una atenuación de los efectos deletéreos asociados a la expresión de VIM-2. Del mismo modo, se podría construir mutantes puntuales de VIM-2 modificando residuos esenciales para la unión del metal y estudiar si su sobreproducción trae aparejada la reducción del *fitness* observada.

Las  $\beta$ -lactamasas de clase B parecen ser el resultado de la evolución divergente a partir de una proteína ancestral carente de actividad  $\beta$ -lactamasa (Bebrone C, 2007). Dichas enzimas pertenecen a la Superfamilia Metaloproteinasas, comparten la misma estructura secundaria ( $\alpha\beta/\beta\alpha$ ) y presentan en su mayoría un centro binuclear metálico. Los miembros de dicha superfamilia difieren ampliamente en su secuencia aminoacídica y participan en procesos tan diversos como hidrólisis, reacciones redox, reparación del ADN y procesamiento de ARN (Garau *et al.*, 2005).

Las enzimas de tipo VIM se describieron por primera vez a finales de la década de 1990 en Europa y están ampliamente distribuidas a nivel mundial (Cornaglia *et al.*, 2011). Desde su descripción inicial a partir de un aislamiento clínico de *Pseudomonas*

*aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999), se han reportado hasta el momento unas 37 variantes ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)) que se agrupan en tres sublinajes distintos y han sido reportadas en microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* así como en distintas enterobacterias (Anexo III, Fig. A3.2A). Actualmente VIM-2 es la metalo- $\beta$ -lactamasa transferible más ampliamente diseminada a nivel global (Borgianni *et al.*, 2010); en nuestro país el Dpto. de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina ha identificado al presente 20 cepas productoras de esta enzima correspondientes a 12 aislamientos de *P. aeruginosa* y 8 de *P. putida* (Papa *et al.*, 2012).

Sin embargo, mundialmente, aún no se han reportado aislamientos de *Salmonella* spp. productoras de enzimas del tipo VIM. De hecho, hasta la fecha solamente se han descrito dos casos sobre la presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en este género, ambos portando el gen *bla*<sub>NDM-1</sub>; el primero corresponde a un aislamiento clínico en Estados Unidos de *Salmonella* Senftenberg (Savard *et al.*, 2011), y el segundo se trata de *Salmonella* Westhampton, aislada en la Isla Reunión (Cabanés *et al.*, 2012). En este sentido la “ausencia” de aislamientos de *Salmonella* spp. productoras de  $\beta$ -lactamasas de clase B y los resultados presentados en este trabajo apoyan la hipótesis de que la expresión de estas enzimas en dicho microorganismo trae aparejado un costo biológico importante. La reducción en el *fitness* asociada a la expresión de VIM-2 en *S. Typhimurium* reportada en esta tesis, incluyendo la tasa reducida de crecimiento, morfología alterada y motilidad e invasividad en células epiteliales reducidas, podría afectar negativamente la colonización intestinal por este patógeno, limitando consecuentemente la diseminación de clones resistentes.

Asimismo, los resultados de los ensayos de crecimiento en ausencia de presión de selección por antibiótico sugieren una mayor tendencia a la pérdida del fenotipo resistente antes que a la aparición de mutaciones compensatorias que atenúen el costo biológico asociado a dicha resistencia; esto a su vez podría explicar también la ausencia de emergencia de este tipo de resistencias entre los aislamientos de *Salmonella* a nivel mundial.

## 8.2 Costo biológico asociado a la expresión de CMY-2.

Durante la fase de trabajo experimental de esta tesis recibimos en el laboratorio del Departamento de Bacteriología y Virología un par de aislamientos clínicos de *S. Typhimurium* (STM709 y STM910) con un perfil de resistencia compatible con la presencia de  $\beta$ -lactamasas de clase C.

Mediante mapeo por PCR y secuenciación se determinó que ambas cepas poseían el gen *bla*<sub>CMY-2</sub>, el cual estaba corriente abajo de la secuencia de inserción *ISEcp1* y corriente arriba de los genes *blc* y *sugE*. Los ensayos de conjugación mostraron que *bla*<sub>CMY-2</sub> estaba presente en plásmidos conjugativos del tipo IncI1 (denominados pSTM709 y pSTM910). Este tipo de arreglo genético se encuentra bastante diseminado a nivel mundial y ha sido reportado en diferentes géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, pero curiosamente asociado únicamente a plásmidos de tipo IncI1 y IncA/C (Verdet *et al.*, 2009).

Posteriormente, el tratamiento con nucleasa S1 seguido de electroforesis en campo pulsado indicó que dichos plásmidos tenían un tamaño aproximado de 85kb, y el análisis por macrorrestricción mostró que ambos aislamientos eran genéticamente distintos. De este modo, STM709 y STM910 se constituyeron en los dos primeros aislamientos de *Salmonella* productoras de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC en nuestro país.

AmpC es una cefalosporinasa cromosómica presente en la mayoría de las enterobacterias y que en ausencia de  $\beta$ -lactámicos participa en el reciclaje del peptidoglicano. Por otra parte, el género *Salmonella* carece en su cromosoma de los genes que codifican para esta enzima y su regulador (Reisbig *et al.*, 2003).

La reducción en el *fitness* de *Salmonella* asociada a la expresión de  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC ya ha sido descrita. En tal sentido, Morosini y cols. estudiaron el comportamiento de *S. Typhimurium* SL1344 luego de ser transformada con plásmidos conteniendo el gen *ampC* por un lado y *ampC* y su regulador *ampR* por otro (Morosini *et al.*, 2000). Dicho grupo de trabajo postuló que en ausencia del mecanismo regulatorio, la síntesis en exceso de AmpC reduciría el *fitness* de dicho microorganismo al interferir con el proceso de síntesis de la pared bacteriana.

Por otra parte, Hossain y cols. estudiaron un aislamiento clínico de *S. Typhimurium* portador de un gen *ampC* plasmídico (*bla*<sub>CMY-7</sub>); dicho aislamiento y los transconjugantes mostraron tener un *fitness* similar al de la cepa control (*S. Typhimurium* LT2). Sin embargo, la transformación de *Salmonella* con *bla*<sub>CMY-7</sub> clonado en otro vector se veía acompañada de una pérdida en la capacidad de invadir cultivos celulares y mostraba menores tasas de crecimiento. De esta manera, concluyeron que la atenuación del costo biológico de expresar *bla*<sub>CMY-7</sub> estaría dada por factores codificados en el plásmido portador de dicho gen, en lugar del regulador natural AmpR (Hossain *et al.*, 2004).

En este trabajo, los distintos ensayos realizados con las cepas STM910 y STM709 mostraron que, mientras la primera evidenciaba un *fitness* similar al de cepas de

referencia, STM709 presentaba menor movilidad, menor capacidad invasiva en cultivos celulares y tendencia a la autoaglutinación. Interesantemente, también se observó que en STM709 la expresión del gen *bla*<sub>CMY-2</sub> fue significativamente mayor que en STM910, a pesar de que las secuencias codificantes así como las secuencias promotoras de dicho gen en pSTM709 y pSTM910 son idénticas. La presencia del regulador de β-lactamasas de clase C, *ampR*, en la cepa STM910 podría explicar la diferencia en los niveles de expresión de *bla*<sub>CMY-2</sub>. Son necesarios ensayos de PCR con cebadores específicos para *ampR* para confirmar o descartar dicha teoría.

La búsqueda de genes asociados a virulencia mostró que la cepa STM709 carece de *spvC* y *pefA*, sugiriendo así la ausencia del plásmido de virulencia de *S. Typhimurium*. Dicho plásmido contribuye al desarrollo de la enfermedad sistémica en el modelo murino al facilitar la replicación de este microorganismo dentro de macrófagos; el operón *spv* está formado por cinco genes (*spvRABCD*) que están vinculados a esta elevada tasa de replicación intracelular y la regulación de éstos es inversa a la de los genes que median la infección del epitelio intestinal (Matsui *et al.*, 2001). Las fimbrias Pef (plasmid encoded fimbriae) a su vez median la adhesión al epitelio intestinal de ratón. La expresión de estas fimbrias parece estar sujeta a un mecanismo de variación de fase que alterna entre la no expresión y la expresión, y ésta a su vez se ve favorecida por ambientes ácidos. Las mutaciones en los genes *pef* parecen influir poco en la virulencia, probablemente porque el genoma de *S. Typhimurium* presenta al menos 11 operones fimbriales con funciones que se solaparían entre sí (van der Woude *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2000).

Tomando en conjunto estos datos, no parece que la reducción en la invasividad de la cepa STM709 observada en los distintos ensayos obedezca únicamente a la ausencia del plásmido de virulencia. De hecho varios estudios ya han demostrado que el plásmido de virulencia de *S. Typhimurium* no está involucrado en la adherencia a cultivos celulares, colonización de las placas de Peyer y la translocación de este microorganismo a través de la mucosa intestinal en modelos animales; más aún, tampoco habría correlación entre el perfil plasmídico de *Salmonella* y su virulencia en general en el hospedero humano (Gulig and Curtiss, 1987; Martin *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, la cepa STM709 mostraba un fenotipo rugoso, evidenciado por una tasa rápida de sedimentación en cultivos líquidos y la presencia de acúmulos bacterianos en preparados para microscopía por contraste de fase. El estudio del LPS reveló la ausencia de las subunidades sacarídicas que componen el antígeno O. Varios grupos de trabajo han estudiado el rol del LPS en la virulencia e

inmunogenicidad de *S. Typhimurium*, y los distintos resultados han sido contradictorios. En este sentido Nagy y cols. generaron mutantes carentes de antígeno O ( $\Delta rfaH::cat$ ,  $\Delta waaG::cat$ ,  $\Delta waaL::cat$ ) y encontraron que las mismas presentaban niveles de invasividad en macrófagos y células epiteliales mayores a los de cepas WT (Nagy *et al.*, 2006). Por otro lado, Bravo y cols. encontraron que la adherencia y posterior ingreso de *S. Typhimurium* a células epiteliales depende de la presencia del disacárido GlcI-GalII (glucosa y galactosa, respectivamente) en la región interna del *core* del LPS; de este modo, las mutaciones/deleciones en el gen *waaG* (responsable de la adición del primer residuo de glucosa –GlcI- en el *core* interno) se traducen en una caída en la capacidad de invadir células epiteliales (Bravo *et al.*, 2011). Del mismo modo, Kong y cols. encontraron que *S. Typhimurium* con deleciones en los genes *waaG* o *waaL* (*waaL* es el responsable de la adición del residuo GalII en el *core* del LPS), sufrían una caída drástica en invasividad y movilidad en agar al 0,3%, y además presentaban menores tasas de crecimiento que cepas WT o cepas con otras alteraciones en el LPS (Kong *et al.*, 2011). Los resultados de invasividad y movilidad obtenidos con la cepa STM709 en la presente tesis así como el perfil del LPS se condicen con la evidencia presentada por este último grupo de trabajo, sugiriendo que dicha cepa tendría su LPS trunco a nivel del *core* oligosacarídico. Sin embargo, nuestros resultados no se ajustan exactamente a esta explicación ya que la tasa de replicación de STM709 es similar a la de las cepas STM910 ( $bla_{CMY-2}^+$ , fenotipo liso) y STM23 (sensible a  $\beta$ -lactámicos, fenotipo liso).

Una posible explicación del fenotipo autoaglutinante de la cepa STM709 proviene de estudios sobre la regulación de la expresión del *pili* de tipo IV, necesario para eventos de conjugación en medio líquido y habitualmente presente en plásmidos de tipo Inc11 y 2 (Gyohda *et al.*, 2000). Dicho *pilus* está codificado por el operon *pil*, consistente en 14 genes designados desde *pilI* hasta *pilV* (Dudley *et al.*, 2006). Adyacente a *pilV* se encuentra el gen *rci*; colectivamente, el gen *rci* y la región 3' de *pilV* se denominan el *shufflon*. La proteína Rci (tirosina-recombinasa) reconoce repetidos invertidos de 19pb (secuencias *sfx*) en la porción C-terminal del gen *pilV*, y actúa invirtiendo regiones de ADN flanqueadas por dichas secuencias *sfx*. A modo de ejemplo, el *shufflon* del plásmido R64 (perteneciente al grupo Inc11) consiste de cuatro segmentos de ADN (A, B, C y D) separados y flanqueados por siete secuencias *sfx*; de este modo pueden generarse siete variantes distintas de la adhesina PilV. Cada una de estas variantes determinan a su vez la especificidad de la célula receptora durante el proceso de conjugación mediante el reconocimiento de distintas estructuras del LPS bacteriano (Ishiwa *et al.*, 2003).

El análisis de sintonía entre el *shufflon* del plásmido pSTM709 y el del plásmido R64, mostró que en el primero, el extremo 3' de *pilV* está conformado por el segmento A'; se vió además la presencia de una inversión de 500pb (en relación al *shufflon* de R64), correspondiente al segmento A. Llamativamente, los segmentos C y D, así como las secuencias *sfx* flanqueantes están ausentes en pSTM709 (Anexo III, Fig. A3.5); este reducido *shufflon* probablemente sea el resultado de dos eventos de recombinación: un evento intramolecula con la pérdida consecuente de los segmentos C y/o D, y otro evento entre dos copias del plásmido dando lugar a la inversión del segmento A (Gyohda *et al.*, 2006).

Interesantemente, Yoshida y cols. encontraron que en cepas de *E. coli* K-12 la presencia de plásmidos que codifican las adhesinas PilVA' o PilVC', a diferencia de otras variantes de PilV, llevaba a la formación de grandes agregados celulares en medios líquidos (Yoshida *et al.*, 1998). En dicho trabajo, Yoshida y cols. mencionaron además que la síntesis de PilVA', -C o -C' se acompañaba de un fenotipo marcadamente rugoso, aunque no especificaron si tal fenotipo era consecuencia directa de la expresión de dichas adhesinas. Entonces, la probable ausencia del antígeno O en la cepa STM709 sumado a la expresión de la adhesina PilVA' explicaría la marcada tendencia a la formación de acúmulos bacterianos de esta cepa en cultivos líquidos. Son necesarios más ensayos para poder determinar si las alteraciones en el LPS de STM709 están relacionadas a la expresión de PilVA' o a cambios (mutaciones o eventos de transposición, entre otros) en alguno de los genes que participan en la síntesis del LPS.

Por otra parte, los ensayos de qRT-PCR mostraron que los niveles de mRNA para *bla<sub>CMY-2</sub>* en STM709 eran aproximadamente tres veces más elevados que en la cepa STM910. Tal diferencia podría ser atribuida a la presencia de mutaciones en el promotor de *bla<sub>CMY-2</sub>* determinando niveles de transcripción mayores o menores (para STM709 y STM910, respectivamente). En este sentido, las regiones promotoras de *bla<sub>CMY-2</sub>* en STM709 y STM910 son idénticas entre sí y, curiosamente, idénticas también a la región promotora de *bla<sub>CMY-7</sub>* descrita por Hossain y cols. Por otra parte, a partir de un aislamiento de *Salmonella* Newport de origen animal, se describió un plásmido portando dos copias de *bla<sub>CMY-2</sub>* (Kang *et al.*, 2006); ambas copias estaban precedidas de un promotor, lo que sugiere que las dos copias contribuirían a la resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, la secuenciación del plásmido pSTM709 mostró la existencia de una sola copia de dicho gen, por lo que las diferencias en los niveles de expresión no serían explicables por este mecanismo. Dejando de lado factores intrínsecos a cada cepa, la presencia en STM709 de niveles más altos de

mARN para *bla*<sub>CMY-2</sub> podría deberse a un mayor número de copias plasmídicas por célula. Recientemente Kurpiel y Hanson describieron que en *E. coli*, la presencia de mutaciones puntuales en el ARN antisentido para el gen *inc* se asociaba a un mayor número de copias plasmídicas y, a un mayor nivel de expresión *bla*<sub>CMY-2</sub> (Kurpiel *et al.*, 2012). La replicación de plásmidos de bajo número de copias está bajo regulación negativa de moléculas de ARN antisentido que se unen a regiones complementarias del transcrito de genes que codifican para proteínas de inicio de replicación (RepZ para plásmidos de tipo Inc1), impidiendo que las mismas sean traducidas (Asano *et al.*, 1998). Consecuentemente, se podría intuir que las diferencias encontradas en los ensayos de qRT-PCR para *bla*<sub>CMY-2</sub> entre STM709 y STM910, serían producto de la presencia de un mayor número de copias del plásmido pSTM709, y que este fenómeno a su vez podría deberse a mutaciones en el ARN antisentido *Inc* y/o en *repZ*. Sin embargo, el análisis *in silico* de la secuencia de ambos genes mostró que no presentan cambios con respecto a la variante WT publicada por Kurpiel y cols., y Anato y cols. (Anexo III, Fig. A3.6). De esta manera, si asumimos que el plásmido pSTM709 posee un sistema de control de replicación WT, podríamos especular sobre la existencia de mutaciones en *inc* y/o *repZ* en el plásmido pSTM910 que determinarían un número “subóptimo” de copias por célula (aunque la bibliografía disponible describe únicamente la existencia de mutaciones que resultan en un aumento del número de copias plasmídicas). Sería interesante poder contar con la secuencia de pSTM910, o al menos la de *inc-repZ* para confirmar o descartar tal teoría.

En suma, la cepa STM709 (*bla*<sub>CMY-2</sub><sup>+</sup>, fenotipo rugoso) mostró un *fitness* disminuido en relación a STM910 (*bla*<sub>CMY-2</sub><sup>+</sup>, fenotipo liso) y a cepas control. Sería interesante poder secuenciar también el plásmido pSTM910 para poder esclarecer las diferencias fenotípicas observadas entre ambos aislamientos. Del mismo modo, sería interesante también transferir el plásmido pSTM709 a otra cepa de *S. Typhimurium* para determinar si se reproducen las distintas alteraciones fenotípicas observadas. Desafortunadamente hasta el momento los ensayos de conjugación usando *S. Typhimurium* como cepa receptora han sido infructuosos.

A pesar de que ya se ha estudiado y demostrado el costo biológico de expresar  $\beta$ -lactamasas de tipo AmpC en *S. Typhimurium*, en la presente tesis no queda claro qué papel, si alguno, cumpliría la expresión de CMY-2 en la pérdida de *fitness* de STM709. Asumiendo que pSTM709 y pSTM910 son similares, el nivel de expresión de *bla*<sub>CMY-2</sub> en STM709 (tres veces mayor al observado en STM910) podría explicar las alteraciones fenotípicas observadas en dicha cepa. Desafortunadamente, no disponemos de suficiente evidencia experimental como para validar o descartar tal

hipótesis. Del mismo modo, se requieren estudios adicionales para poder determinar la causa de las alteraciones en el LPS y la ausencia de *spvC* y *pefA*, y si éstas son a consecuencia de la adquisición del plásmido de resistencia pSTM709, o si se trata de eventos independientes.

En relación a la cepa STM910, lejos de contradecir los hallazgos de numerosos grupos de investigación, nos inclinamos más a pensar que la misma habría seguido un camino de evolución compensatoria. De acuerdo a lo postulado por Dahlberg y Chao, el costo biológico de portar un plásmido conjugativo de resistencia puede atenuarse o incluso ser revertido luego de un periodo de co-evolución entre la bacteria y dicho plásmido (Dahlberg and Chao, 2003). De este modo, podríamos especular que el aislamiento STM910 habría co-existido junto con su plásmido (pSTM910) durante un periodo lo suficientemente largo como para compensar el costo impuesto por el mismo. En este sentido, sería esperable también que la introducción artificial de pSTM709 o pSTM910 en la cepa de laboratorio *S. Typhimurium* SL1344 estuviese acompañada de una pérdida de *fitness*.

## 9. CONCLUSIONES

La hipótesis del presente trabajo planteó que la síntesis de  $\beta$ -lactamasas de clase B o D en *S. Typhimurium* trae aparejado un costo biológico para dicho microorganismo. Para ello se evaluó el comportamiento *in vitro*, bajo distintas condiciones, de la cepa *S. Typhimurium* SL1344 transformada con los genes *bla*<sub>VIM-2</sub> o *bla*<sub>OXA-66</sub>.

Los resultados obtenidos en los distintos ensayos no permiten concluir que la síntesis de OXA-66 afecte el *fitness* de *S. Typhimurium*. Por otra parte, la producción de VIM-2 (constitutiva o regulada) conlleva un costo tal que determina una menor movilidad, tasa de crecimiento, invasividad en células epiteliales y alteraciones en la morfología micro y macroscópica. Este costo biológico podría explicar la ausencia de aislamientos de *Salmonella* productores de este tipo de  $\beta$ -lactamasas.

A pesar de que no habría un costo biológico asociado a la expresión de OXA-66, resulta curioso el hecho que de las más de 300 variantes de dicha enzima, solamente unas pocas han sido encontradas en *Salmonella*. El trabajo de Fernández y cols. mostró que la expresión de determinados alelos de OXA reducían el *fitness* de *E. coli*; en este sentido, podríamos hipotetizar que el bajo número de enzimas derivadas de OXA encontrados en *Salmonella* corresponden justamente a aquéllas que han logrado ser transferidas horizontalmente a este microorganismo y/o que no se acompañan de un costo biológico. Entonces, en ausencia de un costo biológico demostrable, la falta de aislamientos de *Salmonella* portando el gen *bla*<sub>OXA-66</sub> podría deberse a lo primero.

Por otro lado, el mecanismo de las alteraciones asociadas a la expresión de VIM-2 no es claro y la evidencia disponible no permite atribuir tales alteraciones a una única causa. A priori, los cambios observados en la morfología tanto micro como macroscópica sugieren que la síntesis de VIM-2 alteraría la pared de *S. Typhimurium*. En tal sentido, la realización de ensayos de susceptibilidad frente a agentes desestabilizantes podría arrojar más luz al respecto. Aparecen como interrogantes, si el comportamiento observado en *S. Typhimurium* por la producción de VIM-2 es extrapolable a otras metalo- $\beta$ -lactamasas?, se trata de un fenómeno específico de este serotipo o es común al resto del género *Salmonella*. Son necesarios más estudios, usando otras metalo- $\beta$ -lactamasas o usando otros serotipos como modelo para poder responder a estas preguntas. Del mismo modo, la dilucidación del mecanismo exacto por el cual la síntesis de VIM-2 disminuye el *fitness* de *S. Typhimurium* podría ayudar a identificar nuevos blancos bacterianos para la elaboración de moléculas con actividad antibiótica.

La segunda parte de la presente tesis se centró en el estudio de dos aislamientos clínicos (STM709 y STM910) que portaban un plásmido conjugativo que codificaba para la  $\beta$ -lactamasa de clase C, CMY-2.

El aislamiento STM709 presentó menor movilidad e invasividad y tendencia a la autoglutinación; además, STM709 presentaba un LPS trunco y la ausencia de los genes de virulencia *spvC* y *pefA*. Por otro lado, STM910 mostró un comportamiento similar al de las cepas control.

Las diferencias en el *fitness* de ambas cepas podrían obedecer a: i) la presencia o ausencia de mecanismos compensatorios que atenúen la carga impuesta por la expresión de CMY-2; ii) distintos elementos codificados en uno u otro plásmido; o iii) el *background* genético de cada cepa.

Finalmente, la resistencia a los antibióticos, independientemente del modo de adquisición, generalmente conlleva un costo biológico. De manera preocupante, las bacterias se han valido de varios mecanismos para atenuar la pérdida del *fitness* sin comprometer el fenotipo de resistencia. Estos hechos marcan la necesidad de administrar muy prudentemente los antibióticos disponibles y por otro lado de buscar nuevas dianas y drogas para los cuales los costos asociados a la resistencia sean muy elevados y la atenuación de los mismos sea muy improbable.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abergel, C.; Bouveret, E., Claverie, J.M.; Brown, K.; Lazdunski, C. and Bénédicti, H. 1999. Structure of the *Escherichia coli* TolB Protein determined by MAD methods at 1.95Å resolution. *Structure*. **7**: 1291-1300.
- Álvarez-Ordóñez, A.; Begley, M.; Prieto, M.; Messens, W.; López, M.; Bernardo, A. and Hill, C. 2011. *Salmonella* spp. Survival Strategies within the Host Gastrointestinal Tract. *Microbiology*. **157**: 3268-3281.
- Ambler, R.P. and Scott, G.K. 1980 The Structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transaction of the Royal Society (Biological Sciences)*. **289**: 321-331.
- Ammendola, S.; Pasquali, P.; Pacello, F.; Rotilio, G.; Castor, M.; Libby, S.J.; Figueroa-Bossi, N.; Bossi, L.; Fang, F.C. and Battistoni, A. 2008. Regulatory and Structural Differences in the Cu,Zn-Superoxide Dismutases of *Salmonella enterica* and their Significance for Virulence. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**: 13688-13699.
- Anjum, M.F.; Marooney, C.; Fookes, M.; Baker, S.; Dougan, G.; Ivens, A. and Woodward, M.J. 2005. Identification of Core and Variable Components of the *Salmonella enterica* Subspecies I Genome by Microarray. *Infection and Immunity*. **73**: 7894-7905.
- Arlet, G.; Barrett, T.J.; Butaye, P.; Cloeckert, A.; Mulvey, M.R. and White, D.G. 2006. *Salmonella* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins: Prevalence and Epidemiology. *Microbes and Infection*. **8**: 1945-1954.
- Asano, K.; Niimi, T.; Yokoyama, S. and Mizobuchi, K. 1998. Structural basis for Binding of the Plasmid ColIb-P9 Antisense Inc RNA with the 5'-rUUGGcg-3' Motif in the Loop Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**: 11826-11838.
- Bado, I.; García-Fulgueiras, V.; Cordeiro, N.F.; Betancor, L.; Caiata, L.; Seija, V.; Robino, L.; Algorta, G.; Chabalgoity, J.A.; Ayala, J.A. Gutkind, G.O. and Vignoli, R. 2012. First Human Isolate Of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Harboring *bla*<sub>ctx-M-14</sub> in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56**: 2132-2134.
- Barton, B.M., Harding, G.P. and Zuccarelli, A.J. 1995. A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Analytical Biochemistry*. **226**: 235-240.
- Basnyat, B.; Maskey, A.P.; Zimmerman, M.D. and Murdoch, D.R. 2005. Enteric (Typhoid) Fever in Travelers. *Clinical Infectious Diseases*. **41**: 1467-1472.
- Bäumler, A.J.; Tsolis, R.M.; Ficht, T.A. and Adams, L.G. 1998. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity*. **66**: 4579-4587.
- Bebrone, C. 2007. Metallo- $\beta$ -lactamases (Classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and their Superfamily. *Biochemical Pharmacology*. **74**: 1686-1701.
- Betancor, L.; Pereira, M.; Martínez, A.; Giossa, G.; Fookes, M.; Flores, K.; Barrios, P.; Repiso, V.; Vignoli, R.; Cordeiro, N.; Algorta, G.; Thomson, N.; Maskell, D.; Schelotto, F. and Chabalgoity, J.A. 2010. Prevalence of *Salmonella enterica* in Poultry and Eggs in Uruguay during an Epidemic Due to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**: 2413-2423.

- Betancor, L.; Yim, L.; Fookes, M.; Martínez, A.; Thomson, N.R.; Ivens, A.; Peters, S.; Bryant, C.; Algorta, G.; Kariuki, S.; Schelotto, F.; Maskell, D.; Dougan, G. and Chabalgoity, J.A. 2009. Genomic and Phenotypic Variation in Epidemic-Spanning *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates. *BioMed Central Microbiology*. **9**: 237-252.
- Björkman, J. and Andersson, D.I. 2000. The Cost of Antibiotic Resistance from a Bacterial Perspective. *Drug Resistance Updates*. **3**: 237–245.
- Borgianni, L.; Vandenameele, J.; Matagne, A.; Bini, L.; Bonomo, R.A.; Frère, J.M.; Rossolini, G.M. and Docquier, J.D. 2010. Mutational Analysis of Vim-2 Reveals an Essential Determinant for Metallo- $\beta$ -Lactamase Stability and Folding. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**: 3197-3204.
- Botzman, M. and Margalit, H. 2011. Variation in Global Codon Usage Bias Among Prokaryotic Organisms is Associated With Their Lifestyles. *Genome Biology*. **12**: R109.
- Boyle, E.C.; Bishop, J.L.; Grassl, G.A. and Finlay, B.B. 2007. *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. *Journal of Bacteriology*. **189**:1489-1495.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- Bradford, P. 2001. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. **14**: 933-951.
- Bravo, D.; Hoare, A.; Silipo, A.; Valnezuela, C.; Salinas, C.; Álvarez, S.A.; Molinaro, A.; Valvano, M.A. and Contreras, I. 2011. Different Sugar Residues of The Lipopolysaccharide Outer Core are Required for Early Interactions ff *Salmonella enterica* Serovars Typhi and Typhimurium with Epithelial Cells. *Microbial Pathogenesis*. **50**: 70-80.
- Brown, S.; Young, H.K. and Amyes, S.G.B. 2005. Characterization of OXA-51, a Novel Class D Carbapenemase Found in Genetically Unrelated Clinical Strains of *Acinetobacter Baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*. **11**: 15-23.
- Bullas, L.R. and Ryu, J. 1983. *Salmonella typhimurium* LT2 Strains Which are r- m+ for all Three Chromosomally Located Systems of DNA Restriction and Modification. *Journal of Bacteriology*. **156**: 471-474.
- Bush, K. and Jacoby, G.A. 2010. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**: 969–976.
- Bush, K.; Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A.: 1995. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrobial. Agents and Chemotherapy*. **9**: 1211-1233.
- Bustos, S.A. and Schleif, R.F. 1993. Functional Domains of the AraC Protein. *Proceedures of the National Academy of Sciences*. **90**: 5638-5642.
- Cabanes, F.; Lemant, J.; Picot, S.; Simac, C.; Cousty, J.; Jalin, L.; Naze, F.; Boisson, V.; Cresta, M.P.; André, H.; Thibault, L.; Tixier, F.; Winer, A.; Antok, E. and Michault, A.

2012. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* metallo-beta-lactamase (NDM-1) Producers on Reunion Island. *Journal of Clinical Microbiology*. **50**: 3812-3813.
- Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K.L. and Threlfall, E.J. 2005. Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing. *Journal of Microbiological Methods*. **63**: 219-228.
- Carver, T.J.; Rutherford, K.M.; Berriman, M.; Rajandream, M.A.; Barrell, B.G. and Parkhill, J. 2005. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **21**: 3422-3423.
- Casdaban, M.J. and Cohen, S.H. 1980. Analysis of Gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*. **138**: 179-207.
- Chambers, H. F. 1997. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**: 781–791.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- Cordeiro, N.F.; Yim, L.; Betancor, L.; Cejas, D.; García-Fulgueiras, V.; Mota, M.I.; Varela, G.; Anzalone, L.; Algorta, G.; Gutkind, G.; Ayala, J.A.; Chabalgoity, J.A. and Vignoli, R. 2013. Identification of the First *bla*<sub>cmv-2</sub> Gene in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Cases of Paediatric Diarrhoea Illness Detected in South America. Aceptado para su publicación a *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.
- Cornaglia, G.; Giamarellou, H. and Rossolini, G.M. 2011. Metallo-β-lactamases: a Last Frontier for β-lactams? *The Lancet Infectious Diseases*. **11**: 381-393.
- Craig, C.L. and Weber, R.S. 1998. Selection Costs of Amino Acid Substitutions in ColE1 and ColIa Gene Clusters Harbored by *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*. **15**: 774-776.
- Crump, J.A. and Mintz, E.D. 2010. Global Trends in Typhoid and Paratyphoid Fever. *Clinical Infectious Diseases*. **50**: 241-246.
- Dahlberg, C. and Chao, L. 2003. Amelioration of the Cost of Conjugative Plasmid Carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*. **165**: 1641-1649.
- Darwin, K.H. and Millar, V.L. 1999. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. *Clinical Microbiology Reviews*. **12**: 405-428.
- Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. 2000. One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**: 6640-6645
- Davies, J. and Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **74**: 417-433.
- Depardieu, F.; Podglajen, I.; Leclercq, R.; Collatz, E. and Courvalin, P. 2007. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clinical Microbiology Reviews*. **20**: 79-114.

Docquier, J.D.; Lamotte-Brasseur, J.; Galleni, M.; Amicosante, G.; Frère, J.M. and Rossolini, G.M. 2003. On functional and Structural Heterogeneity of VIM-Type Metallo- $\beta$ -Lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: 257-266.

Drawz, S.M. and Bonomo, R.A. 2010. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. **23**: 160-201.

Durso, L.M.; Smith, D. and Hutkins, R.W. 2004. of Fitness and Competition in Commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 6466-6472.

Dudley, E.G.; Abe, C.; Ghigo, J.M.; Latour-Lambert, P.; Hormazabal, J.C. and Nataro, J.P. 2006. An Inc11 Plasmid Contributes to the Adherence of the Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain C1096 to Cultured Cells and Abiotic Surfaces. *Infection and Immunity*. **74**: 2102-2114.

Enne, V.I.; Delsol, A.A.; Davis, G.R.; Hayward, S.L.; Roe, J.M. and Bennett, P.M. 2005. Assessment of the Fitness Impacts on *Escherichia coli* of Acquisition of Antibiotic Resistance Genes Encoded by Different Types of Genetic Element. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **56**: 544-551.

Enne, V.I.; Delsol, A.A.; Roe, J.M. and Bennett, P.M. 2006. Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 3003-3010

Fernández, A.; Pérez, A.; Ayala, J.A.; Mallo, S.; Rumbo-Feal, S.; Tomás, M.; Poza, M. and Bou, G. 2012. Expression of OXA-type and SFO-1  $\beta$ -Lactamases Induces Changes in Peptidoglycan Composition and Affects Bacterial Fitness. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **56**: 1877-1884.

Fierer, J. and Guiney, D.G. 2001. Diverse Virulence Traits Underlying Different Clinical Outcomes of *Salmonella* Infection. *Journal of Clinical Investigation*. **107**: 775-780.

Fricke, W.F.; McDermott, P.F.; Mammel, M.K.; Zhao, S.; Johnson, T.J.; Rasko, D.A.; Fedorka-Cray, P.J.; Pedroso, A.; Whichard, J.M.; LeClerc, J.E.; White, D.G.; Cebula, T.A. and Ravel, J. 2009. Antimicrobial Resistance-Confering Plasmids with Similarity to Virulence Plasmids from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strains in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky Isolates from Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 5963-5971.

Fontana, R.; Aldegheri, M.; Ligozzi, M.; Lopez, H.; Sucari, A. and Satta, G. 1994. Overproduction of a Low-Affinity Penicillin-Binding Protein and High-Level Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **38**: 1980-1983

Fuhrmann, M.; Hausherr, A.; Ferbitz, L.; Schödl, T.; Heitzer, M. and Hegemann, P. 2004. Monitoring Dynamic Expression of Nuclear Genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by Using a Synthetic Luciferase Reporter Gene. *Plant Molecular Biology*. **55**: 869-881.

Galleni, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Rossolini, G.M.; Spencer, J.; Dideberg, O.; Frère, J.M. and The Metallo  $\beta$ -lactamase Working Group. 2001. Standard Numbering Scheme for Class B  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**: 660-663.

- Garau, G.; Di Guilmi, A.M. and Hall, B.G. 2005. Structure-Based Phylogeny of the Metallo- $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**: 2778-2784.
- Giraud, E.; Cloeckaert, A.; Baucheron, S.; Mouline, C. and Chaslus-Dancla, E. 2003. Fitness Cost of Fluoroquinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*. **52**: 697-703.
- González-Sanz, R.; Herrera-León, S.; de la Fuente, M.; Arroyo, M. and Echeita, M.A. 2009. Emergence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases in Human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **64**: 1181-1186.
- Goussard, S. and Courvalin, P. 1999. Updated Sequence Information for TEM  $\beta$ -Lactamases Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**: 367-370.
- Gruber, A.R.; Lorenz, R. Bernhart, S.H.; Nueböck, R. and Hofacker, I.L. 2008. The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*. **36**: W70-W74.
- Guan, J.; Grenier, C. and Brooks B.W. 2006. In Vitro Study of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* Definitive Type 104: Survival in Egg Albumen and Penetration through the Vitelline Membrane. *Poultry Science*. **85**: 1678–1681.
- Guerrant, R.L.; Van Gilder, T.; Steiner, T.S.; Thielman, N.M.; Slutsker, L.; Tauxe, R.V.; Hennessy, T.; Griffin, P.M.; DuPont, H.; Sack, R.B.; Tarr, P.; Neill, M.; Nachamkin, I.; Reller, L.B.; Osterholm, M.T.; Bennis, M.L. and Pickering, L.K. 2001. Practice Guidelines for the Management of Infectious Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases*. **32**: 331-350.
- Gulig, P.A. and Curtiss III, R. 1987. Plasmid-Associated Virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*. **55**: 2891-2901.
- Gustafsson, C.; Govindarajan, S. and Minshull, J. 2004. Codon Bias and Heterologous Protein Expression. *TRENDS in Biotechnology*. **22**: 346-353.
- Gutkind, G.O. Di Conza, J.; Power, P. and Radice, M. 2013.  $\beta$ -Lactamase-Mediated Resistance: a Biochemical, Epidemiological and Genetic Overview. *Current Pharmaceutical Design*. **19**: 164-208.
- Guzman, L.M.; Belin, D.; Carson, M.J. and Beckwith, J. 1995. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P<sub>BAD</sub> Promoter. *Journal of Bacteriology*. **177**: 4121–4130.
- Gyohda, A. and Komano, T. 2000. Purification and Characterization of the R64 Shufflon-Specific Recombinase. *Journal of Bacteriology*. **182**: 2787-2792.
- Gyohda, A.; Zhu, S.; Furuya, N. and Komano, T. 2006. Asymmetry of Shufflon-Specific Recombination Sites in Plasmid R64 Inhibits Recombination Between Direct *sfx* Sequences. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**: 20772-20779.
- Hakenbeck, R., and J. Coyette. 1998. Resistant Penicillin-Binding Proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **54**: 332–340.
- Hanahan, D. 1985. in *DNA Cloning: A practical Approach* (Glover, D.M., ed.), Vol. 1, p. 109. IRL Press, McLean, Virginia.

- Haque, A.; Bowe, F.; Fitzhenry, R.J.; Frankel, G.; Thomson, M.; Heuschkel, R.; Murch, S.; Stevens, M.P.; Wallis, R.S.; Philips, A.D. and Dougan, G. 2004. Early Interactions of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium with Human Small Intestinal Epithelial Explants. *Gut*. **53**: 1424-1430.
- Haraga, A.; Ohlson, M.B. and Miller, S.I. 2007. Salmonellae Interplay with Host Cells. *Nature Reviews Microbiology*. **6**: 53-66.
- Hitchcock, P.J. and Brown, T.M. 1983. Morphological Heterogeneity Among *Salmonella* Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Journal of Bacteriology*. **154**: 269-277.
- Hoiseth, S.K. and Stocker, B.A. 1981. Aromatic-Dependent *Salmonella typhimurium* are Non-Virulent and Effective as Live Vaccines. *Nature*. **219**: 238-239.
- Hossain, A.; Reisbig, M.D. and Hanson, N.D. 2004. Plasmid-Encoded Functions Compensate for the Biological Cost of AmpC Overexpression in a Clinical Isolate of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **53**: 964–970.
- Hu, W.S.; Yao, S.H.; Fung, C.P.; Hsieh, Y.P.; Liu, C.P. and Lin J.F. 2007. An OXA-66/OXA-51 like Carbapenemase and Possibly an Efflux Pump are Associated with Resistance to Imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 3844-3852.
- Hu, Z.; Gunasekera, T.S.; Spadafora, L.; Bennett, B. And Crowder, M.W. 2008. Metal Content of Metallo- $\beta$ -Lactamase L1 is Determined by the Bioavailability of Metal Ions. *Biochemistry*. **47**: 7947-7953.
- Ishiwa, A. and Komano, T. 2003. Thin Pilus PilV Adhesins of Plasmid R64 Recognize Specific Structures of the Lipopolysaccharide Molecules of Recipient Cells. *Journal of Bacteriology*. **185**: 5192-5199.
- Jacoby, G.A. 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**: 161-182.
- Kang, M.S.; Besser, T.E. and Call, D.R. 2006. Variability in the Region Downstream of the *bla*<sub>CMY-2</sub>  $\beta$ -Lactamase Gene in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 1590-1593.
- Kim, S.H. and Wei, C.I. 2007. Invasiveness and Intracellular Growth of Multidrug-Resistant *Salmonella* and other Pathogens in Caco-2 Cells. *Journal of Food Science*. **72**: M72-78.
- Kong, Q.; Yang, J.; Liu, Q.; Alamuri, P.; Roland, K.L. and Curtiss, R. 2011. Effect of Deletion of Genes Involved in Lipopolysaccharide Core and O-Antigen Synthesis on Virulence and Immunogenicity of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. **79**: 4227-4239.
- Kurpiel, P.M.; and Hanson, N.D. 2012. Point Mutations in the *inc* Antisense RNA Gene are Associated with Increased Plasmid Copy Number, Expression of *bla*<sub>CMY-2</sub> and Resistance to Piperacillin/Tazobactam in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**: 339-345.
- Langridge, G.C; Wain, J. and Nair, S. 2008. Invasive Salmonellosis in Humans. In *EcoSal: Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology* (Bock, A.;

Curtiss III, R.; Kaper, J.B.; Karp, P.D.; Neidhart, F.C.; Nystrom, T.; Slauch, J.M. and Squires, C.L.) 2<sup>nd</sup> Edit.

Lauretti, L.; Riccio, M.L.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante G.; Fontana, R. and Rossolini, G.M. 1999. Cloning and Characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a New Integron-Borne Metallo-β-Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **43**: 1584-1590.

Layton, A.N. and Galyov, E.E. 2007. *Salmonella*-Induced Enteritis: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **9**: DOI: 10.1017/S1462399407000373.

Levy, E.; Merhan, M. and Seidman, E. 1995. Caco-2 Cells as a Model for Intestinal Lipoprotein Synthesis and Secretion. *The FASEB Journal*. **9**: 626-635.

Liu, W.Q.; Feng, Y. Wang, Y.; Zou, Q.H.; Chen, F.; Guo, J.T.; Peng, Y.H.; Jin, Y.; Li, Y.G.; Hu, S.N.; Johnston, R.N. Liu, G.R. and Liu, S.L. 2009. *Salmonella paratyphi C*: Genetic Divergence from *Salmonella choleraesuis* and Pathogenic Convergence with *Salmonella typhi*. *Public Library of Sciences (PLoS) One*. **4**: e4510.

Livak, K.J. and Schmitthen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> Method. *Methods*. **25**: 402-408.

Livermore, D.M. 1995. β-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. **8**: 557-584.

Macedo-Viñas, M.; Cordeiro, N.F.; Bado, I.; Herrera-León, S.; Vola, M.; Robino, L.; Gonzalez-Sanz, R.; Mateos, S.; Schelotto, F.; Algorta, G.; Ayala, J.A.; Echeita, A. and Vignoli, R. 2008. Surveillance of Antibiotic Resistance Evolution and Detection of Class 1 and 2 Integrons in Human Isolates of Multi-Resistant *Salmonella* Typhimurium Obtained in Uruguay Between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases*. **13**: 342-348.

Maisnier-Patin, S. and Andersson, D.I. 2004. Adaptation to the Deleterious Effects of Antimicrobial Drug Resistance Mutations by Compensatory Evolution. *Research in Microbiology*. **155**: 360–369.

Maisnier-Patin, S.; Berg, O.G.; Liljas, L. and Andersson, D.I. 2002. Compensatory Adaptation to the Deleterious Effect of Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology* **2**: 355–366.

Marciano, D.C.; Karkouti, O.Y. and Palzkill, T. 2007. A Fitness Cost Associated With the Antibiotic Resistance Enzyme SME-1 β-Lactamase. *Genetics*. **176**: 2381-2392.

Martin, G.D.; Chart, H.; Threlfall, E.J.; Morgan, E.; Lodge, J.M.; Brown, N. and Stephen, J. 2000. Invasiveness of *Salmonella* Serotypes Typhimurium and Enteritidis of Human Gastro-Enteritic Origin for Rabbit Ileum: Role of LPS, Plasmids and Host Factors. *Journal of Medical Microbiology*. **49**: 1011-1021.

Martínez, J.L. and Baquero, F. 2000. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**: 1771-1777.

Massova, I. and Mobashery, S. 1998. Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**: 1-17.

- Mata, C.; Miró, E.; Alvarado, A.; Garcillán-Barcia, M.P.; Toleman, M.; Walsh, T.R., de la Cruz, F. and Navarro, F. 2012. Plasmid Typing and Genetic Context of AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Inducible Chromosomal *ampC* Genes: Findings from a Spanish Hospital 1999-2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**: 115-122.
- Matagne, A.; Lamotte-Brasseur, J. and Frere, J.M.: 1998 Catalytic Properties of Class A  $\beta$ -lactamases: Efficiency and Diversity. *Biochemical Journal*. **330**: 581-598.
- Matsui, H.; Bacot, C.M.; Garlington, W.A.; Doyle, T.J. Roberts, S. and Gulig, P. 2001. Virulence Plasmid-Borne *spvB* and *spvC* Genes can Replace the 90-Kilobase Plasmid Conferring Virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Subcutaneously Inoculated Mice. *Journal of Bacteriology*. **183**: 4652-4658.
- Medina, C.; Camacho, E.M.; Flores, A.; Mesa-Pereira, B. and Santero, E. 2011. Improved Expression Systems for Regulated Expression in *Salmonella* Infecting Eukaryotic Cells. *Public Library of Sciences (PLoS) ONE*. **6**: e23055.
- Michael, G.B.; Cardoso, M. and Schwarz, S. 2008. Molecular Analysis of Multiresistant Porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Bredeney Isolates from Southern Brazil: Identification of Resistance Genes, Integrons and a Group II Intron. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **32**: 120-129.
- Misselwitz, B.; Barrett, N.; Kreibich, S.; Vonaesch, P.; Andritschke, D.; Rout, S.; Weidner, K.; Sormaz, M.; Songhet, P.; Horvath, P.; Chabria, M.; Vogel, V.; Spori, D.M.; Jenny, P. and Hardt, W.F. 2012. Near Surface Swimming of *Salmonella* Typhimurium Explains Target-Site Selection and Cooperative Invasion. *Public Library of Sciences (PLoS) Pathogens*. **8**: e1002810.
- Miriagou, V.; Tzouveleakis, L.S.; Rossiter, S.; Tzelepi, E.; Angulo, F.J. and Whichard, J.M. 2003. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **47**: 1297-1300.
- Mnif, B.; Vimont, S.; Boyd, A.; Bourit, E.; Picard, B.; Branger, C.; Denamur, E. and Arlet, G. 2010. Molecular Characterization of Addiction Systems of Plasmids Encoding Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **65**: 1599-1603.
- Moellering Jr., R.C. and Eliopoulos, G.M. 2005. Principles of Anti-infective Therapy. *In* Principles and Practice of Infectious Diseases (Mandell, G.L; Bennett, J.E. and Dolin, R.) 6<sup>th</sup> Edit.
- Morosini, M.I.; Ayala, J.A.; Baquero, F.; Martinez, J.L. and Blázquez, J. 2000. Biological Cost of AmpC Production for *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44**: 3137-3143.
- Mulvey, M.R.; Boyd, D.A.; Baker, L.; Mykytczuk, O.; Reis, E.M.; Asensi, M.D.; Rodrigues, D.P. and Ng, L.K. 2004. Characterization of a *Salmonella enterica* Serovar Agona Strain Harbouring a Class 1 Integron Containing a Novel OXA-type Beta-Lactamase (*bla*<sub>OXA-53</sub>) and 6'-N-Aminoglycoside Acetyltransferase Genes [*aac(6')*-I30]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **54**: 354-359.

- Nagy, G.; Danino, V.; Dobrindt, U.; Pallen, M.; Chaudhuri, R.; Emödy, L.; Hinton, J.C. and Hacker, J. 2006. Down-Regulation of Key Virulence Factors Makes the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *rfaH* Mutant a Promising Live-Attenuated Vaccine Candidate. *Infection and Immunity*. **74**: 5914-5925.
- Nicholson, B. and Low, D. 2000. DNA Methylation-Dependent Regulation of Pef Expression in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*. **35**: 728-742.
- O'Regan, E.; Quinn, T.; Frye, J.G. Pagès, J.M.; Porwollik, S.; Fedorka-Cray, P.J.; McClelland, M. and Fanning, S. 2010. Fitness Cost and Stability of a High-Level Ciprofloxacin Resistance Phenotype in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis: Reduced Infectivity Associated with Decreased Expression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**: 367-374.
- Oberhofer, T.R. and Towle, D.W. 1982. Evaluation of the Rapid Penicillinase Paper Strip for Detection of Beta-Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology*. **15**: 196-199.
- Opal, S.M. and Medeiros, A. 2005. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. *In Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell, G.L; Bennett, J.E. and Dolin, R.) 6<sup>th</sup> Edit.
- Papa, R.; Bado, I.; Hitateguy, P.; Gutiérrez, C.; Seija, V. y Vignoli, R. 2012. Carbapenemasas de tipo VIM-2 en *Pseudomonas* spp. XIV Congreso Uruguayo de Patología Clínica, IV Jornadas de Residentes de Laboratorio. Montevideo.
- Papadacos, G.; Housden, N.G.; Lilly, K.J.; Kaminska, R. and Kleanthous C. 2012. Kinetic Basis for the Competitive Recruitment of TolB by the Intrinsically Disordered Translocation Domain of Colicin E9. *Journal of Molecular Biology*. **418**: 269-280.
- Papp-Wallace, K.M.; Endimiani, A.; Taracila, M.A. and Bonomo, R.A. 2011. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**: 4943-4960.
- Pegues, D.A.; Ohl, M.E. and Millar, S.I. 2005. *Salmonella* Species, Including *Salmonella* Typhi. *In Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell, G.L.; Bennett, J.E. and Dolin, R.) 6<sup>th</sup> Edit.
- Pérez-Pérez, F.J. and Hanson, N.D. 2002. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**: 2153-2162.
- Philippon, A.; Arlet, G. and Jacoby, G.A. 2002. Plasmid-Determined AmpC-type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**: 1-11.
- Poirel, L.; Naas, T. and Nordmann, P. 2010. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**: 24-38.
- Rasmussen, B.A.; and Bush, K.: 1997 Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamases *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **41**: 223–232.
- Rasmussen, J.W. and Hoiby, N. 2006. Oxa-Type Carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**: 373-383.
- Reisbig, M.D.; Hossain, A. and Hanson, N.D. 2003. Factors Influencing Gene Expression and Resistance for Gram-Negative Organisms Expressing Plasmid-

- Encoded *ampC* Genes of *Enterobacter* Origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **51**: 1141-1151.
- Rice, L.B. and Bonomo R.A. 2011. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. *In Manual of Clinical Microbiology* (Versalovic, J.; Carroll, K.C.; Funke, G.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L. and Warnock, D.W.) 10<sup>th</sup> Edit.
- Rigal, A.; Bouveret, E.; Llobes, R.; Lazdunski, C. and Benedetti, H. 1997. The TolB Protein Interacts with the Porins of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **179**: 7274-7279.
- Rusch, S.L. and Kendall, D.A. 2007. Interactions that Drive Sec-Dependent Bacterial Protein Transport. *Biochemistry*. **46**: 9665-9673.
- Rybkin, T., Mainardi, J.L.; Sougakoff, W.; Collatz, E. and Gutmann, L. 1998. Penicillin-Binding Protein 5 Sequence Alterations in Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* with Different Levels of  $\beta$ -Lactam Resistance. *Journal of Infectious Diseases*. **178**: 159-163.
- Rychlik, I.; Gregorova, D. and Hradecka, H. 2006. Distribution and Function of Plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*. **112**: 1-10.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sansone, A.; Watson, P.R.; Wallis, T.S.; Langford, P.R. and Kroll, J.S. 2002. The Role of Two Periplasmic Copper- and Zinc-Cofactored Superoxide Dismutases in the Virulence of *Salmonella choleraesuis*. *Microbiology*. **148**: 719-726.
- Sansonetti, P.J. 2004. War and Peace at Mucosal Surfaces. *Nature Reviews Immunology*. **4**: 953-964.
- Savard, P.; Gopinath, R.; Wenming, Z.; Kitchel, B.; Rasheed, J.K.; Tekle, T.; Roberts, A.; Ross, T.; Razeq, J.; Landrum, B.M.; Wilson, L.E.; Limbago, B.; Perl, T.M. and Carroll, K.C. 2011. First NDM-Positive *Salmonella* sp. Strain Identified in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **55**: 5957-5958.
- Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*. **1**: 16-23.
- Schmitt, C.K.; Ikeda, J.S.; Darnell, S.C.; Watson, P.R.; Bispham, J.; Wallis, T.S.; Weinstein, D.I.; Metcalf, E.S. and O'Brien, A.D. 2001. Absence of all Components of the Flagellar Export and Synthesis Machinery Differentially Alters Virulence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Models of Typhoid Fever, Survival in Macrophages, Tissue Cultures Invasiveness, and Calf Enterocolitis. *Infection and Immunity*. **69**: 5619-5625.
- Shabalina, S.A.; Spiridonov, N.A. and Kashina, A. 2013. Sounds of Silence: Synonymous Nucleotides as a Key to Biological Regulation and Complexity. *Nucleic Acids Research*. **41**: 2073-2094.
- Shin, S.Y.; Kwon, K.C.; Park, J.W.; Song, J.H.; Ko, Y.H.; Sung, J.Y.; Shin, H.W. and Koo, S.H. 2009. Characteristics of *aac(6')-Ib-cr* Gene in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Chungnam Area. *Korean Journal of Laboratory Medicine*. **29**: 541-550.

- Smith, D.I.; Gomez Lus, R.; Rubio Calvo, M.C.; Datta, N.; Jacob, A.E. and Hedges, R.W. 1975. Third Type of Plasmid Conferring Gentamicin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **8**: 227-230.
- Smith, D.R. and Chapman, M.R. 2010. Economical Evolution: Microbes Reduce the Synthetic Cost of Extracellular Proteins. *mBio*. **1**: e00131-10.
- Su, L.H.; Chen, H.L.; Chia, J.H.; Liu, S.Y.; Chu, C.; Wu, T.L. and Chiu, C.H. 2006. Distribution of a Transposon-Like Element Carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **57**: 424-429.
- Swaminathan, B.; Barrett, T.J.; Hunter, S.B.; Tauxe, R.V. and CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the Molecular Subtyping, Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*. **7**: 382-389.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. **24**: 1596-1599.
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Mickelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**: 2233-2239.
- Thielman, N.M.; Crump, J.A. and Guerrant, R.L. 2009. Enteric Fever and Other Causes of Abdominal Symptoms with Fever. In *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell, G.L.; Bennett, J.E. and Dolin, R.) 7<sup>th</sup> Edit.
- Toleman, M.A.; Vinodh, H.; Sekar, U.; Kamat, V. and Walsh, T.R. 2007. *bla*<sub>VIM-2</sub>-Harboring Integrons Isolated in India, Russia, and the United States Arise from an Ancestral Class 1 Integron Predating the Formation of the 3' Conserved Sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 2636-2638.
- Tracz, D.M.; Tabor, H.; Jerome, M.; Ng, L.K. and Gilmour, M.W. 2006. Genetic Determinants and Polymorphisms Specific for Human-Adapted Serovars of *Salmonella enterica* that Cause Enteric Fever. *Journal of Clinical Microbiology*. **44**: 2007-2018.
- Tran, Q.T.; Gomez, G.; Khare, S.; Lawhon, S.D.; Raffatellu, M.; Bäumler, A.J.; Ajithdoss, D.; Dhavala, S. and Adams, L.G. 2010. The *Salmonella enterica* Serotype Typhi Vi Capsular Antigen Is Expressed after the Bacterium Enters the Ileal Mucosa. *Infection and Immunity*. **78**: 527-535.
- Tsai, C.M. and Frasch, C.E. 1982. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*. **119**: 115-119.
- Valdez, C.E. and Alexandrova, A.N. 2012. Why Urease is a di-Nickel Enzyme Whereas the CcrA  $\beta$ -Lactamase is a di-Zinc Enzyme. *The Journal of Physical Chemistry B*. **35**: 10649-10656.
- Van der Woude, M.W. and Bäumler, A.J. 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **17**: 581-611.
- Verdet, C.; Gautier, V.; Chachaty, E.; Ronco, E.; Hidri, N.; Decré, D. and Arlet, G. 2009. Genetic Context of Plasmid-Carried *bla*<sub>CMY-2</sub>-Like Genes in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**: 4002-4006.

- Vignoli, R.; Cordeiro, N.F.; García, V.; Mota, M.I.; Betancor, I.; Power, P.; Chabalgoity, J.A.; Schelotto, F.; Gutkind, G. and Ayala, J.A. 2006. New TEM-Derived Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase and Its Genomic Context in Plasmids from *Salmonella enterica* Serovar Derby Isolates from Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 781-784.
- Walsh, T.R.; Toleman, M.A.; Poirel, L. and Nordmann, P. 2005. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*. **18**: 306-325.
- Wang, Z.; Fast, W.; Valentine A.M.; and Benkovic, S.: 1999 Metallo- $\beta$ -Lactamase: Structure and Mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*. **3**: 614-622.
- Winter, S.E.; Kestra, A.M.; Tsolis, R.M. and Bäumler, A.J. 2010. The Blessings and Curses of Intestinal Inflammation. *Cell Host Microbe*. **8**: 36-43.
- Welch, B. L. 1951. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach. *Biometrika*. **38**: 330-336.
- Ye, J.; Coulouris, G.; Zaretskaya, I.; Cutcutache, I.; Rozen, S. and Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BioMed Central Bioinformatics*. **13**: 134.
- Yim, L.; Betancor, L.; Martínez, A.; Bryant, C.; Maskell, D. and Chabalgoity, J.A. 2011. Naturally Occurring Motility-Defective Mutants of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolated Preferentially from Nonhuman Rather than Human Sources. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**: 7740-7748.
- Yoshida, T.; Furuya, N.; Ishikura, M.; Isobe, T.; Haino-Fukushima, K.; Ogawa, T. and Komano, T. 1998. Purification and Characterization of Thin Pili of IncI1 Plasmids Collb and R64: Formation of PilV-Specific Cell Aggregates by Type IV Pili. *Journal of Bacteriology*. **180**: 2842-2848.
- Zhang, Q.; Sahin, O.; McDermott, P.F. and Payot, S. 2006. Fitness of Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. *Microbes and Infection*. **8**: 1972-1978.
- Zhang, S; Kingsley, R.A.; Santos, R.L.; Andrews-Polymenis, H.; Raffatellu, M.; Figueiredo, J.; Nunes, J.; Tsolis, R.M.; Adams, G.L. and Bäumler, A.J. 2003. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. *Infection and Immunity*. **71**: 1-12.
- Zervosen, A.; Sauvage, E.; Frère, J.M.; Charlier, P. and Luxen, A. 2012. Development of New Drugs for an Old Target – the Penicillin Binding Proteins. *Molecules*. **17**: 12478-12505.

## ANEXO I: SOLUCIONES DE TRABAJO

- Medio LB      10 g triptona  
                  5 g extracto de levadura  
                  5 g NaCl  
                  Llevar a 1000mL con H<sub>2</sub>O, ajustar a pH 7.5 y autoclavar.
- Agar LB        Medio LB + agar 1.5 % (p/v). Autoclavar.
- Agar TSA      17 g digerido de caseína  
                  3 g digerido de soya  
                  5 g NaCl  
                  2.5 g dextrosa  
                  2.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                  1.5% agar (p/v).  
                  Llevar a 1000mL con H<sub>2</sub>O. Autoclavar.
- Agar McConkey Lactosa      20g Peptonas  
  10g lactosa  
  1.5g sales biliares  
  3g NaCl  
  0.03g rojo neutro  
  0.001g cristal violeta  
  1.5% agar (p/v).  
  Llevar a 1000ml con H<sub>2</sub>O. Autoclavar.
- PBS      0.2 g KCl  
            0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
            1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
            8 g NaCl  
            Llevar a 1000mL con H<sub>2</sub>O; ajustar a pH 7.4 con NaOH o HCl.
- 5X TBE    54 g Tris base  
            27.5 g Ácido bórico  
            20mL 0.5M EDTA, pH 8.0  
            Llevar a 1000ml con H<sub>2</sub>O

10X Buffer Tricina-SDS      60.5 g Tris base  
   89.5 g Tricina  
   5 g SDS  
   Llevar a 500ml con H<sub>2</sub>O

3X Gel Buffer 36.33 g Tris base  
   0.3 g SDS  
   8.3 ml HCl 37%  
   Llevar a 100 ml con H<sub>2</sub>O

Solución de oxidación      1.05 g Ácido peryódico  
   150 ml H<sub>2</sub>O  
   4 ml 2-propanol 25%, en ácido acético 7%

Solución de tinción      6 ml AgNO<sub>3</sub> 20% (p/v)  
   33.6 ml NaOH 0,1M  
   2.4 ml NH<sub>4</sub>OH  
   Llevar a 200 ml con H<sub>2</sub>Omq

Solución de revelado 25 mg Ácido cítrico  
   150 µl Formaldehído  
   Llevar a 500 ml con H<sub>2</sub>Omq

Solución *stop* 7% Ácido acético (v/v)

Acetato de Sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 3M 408.3 g de CH<sub>3</sub>COONa•3H<sub>2</sub>O  
   800 ml de H<sub>2</sub>O.  
   Ajustar a pH 5.2 con ácido acético glaciar y llevar  
   a 1L con H<sub>2</sub>O. Autoclavar.

## ANEXO II

Anotación parcial del plásmido pSTM709 obtenido de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium STM709.

| Posición    | Elemento / CDS   | Orientación    |
|-------------|--|----------------|
| 364-442     | ARN antisentido PK-RepZ  | Directo        |
| 378-467     | <i>repY</i> (regulador positivo de <i>repZ</i> )                         | Directo        |
| 410-1483    | <i>repZ</i> (proteína de inicio de replicación)                          | Directo        |
| 2395-2661   | <i>yacA</i> (Sistema toxina-antitoxina, componente antitoxina)           | Directo        |
| 2661-2939   | <i>yacB</i> (Sistema toxina-antitoxina)                                  | Directo        |
| 2982-3827   | <i>yacC</i> (Sistema toxina-antitoxina, componente toxina)               | Directo        |
| 3947-4417   | <i>yadA</i> (proteína hipotética)  | Directo        |
| 4555-4785   | <i>yaeA</i> (proteína hipotética)  | Directo        |
| 5166-5657   | <i>yafA</i> (proteína hipotética)  | Complementario |
| 5716-6315   | <i>finO</i> (proteína de inhibición de fertilidad)                       | Complementario |
| 6645-7580   | <i>yagA</i> (proteína hipotética)  | Directo        |
| 7736-8995   | <i>tnpA</i> (transposasa de la secuencia de inserción ISEcp1)            | Directo        |
| 9322-10464  | <i>bla<sub>CMY-2</sub></i> (betalactamasa de clase C)                    | Directo        |
| 10561-11091 | <i>blc</i> (lipoproteína de membrana externa)                            | Directo        |
| 11094-11525 | <i>sugE</i> (proteína de resistencia a compuestos de amonio cuaternario) | Complementario |
| 12209-14086 | <i>cib</i> (colicina Ib)   | Directo        |
| 14110-14454 | <i>imm</i> (proteína de inmunidad a colicina Ib)                         | Complementario |
| 14835-15659 | SeT1 (proteína hipotética)   | Directo        |
| 16077-17132 | SeT2 (proteína hipotética)   | Directo        |
| 18432-19397 | SeT3 (proteína hipotética)   | Directo        |
| 19925-20152 | <i>ccdA</i> (sistema toxina-antitoxina, componente antitoxina)           | Directo        |
| 20157-20459 | <i>ccdB</i> (sistema toxina-antitoxina, proteína citotóxica CcdB)        | Directo        |
| 20463-21266 | <i>resD</i> (resolvasa perteneciente a la familia de integrasas fágicas) | Directo        |
| 21398-22090 | <i>parA</i> (proteína de partición y estabilidad plasmídica)             | Directo        |
| 22848-23879 | <i>parM</i> (proteína de segregación plasmídica)                         | Directo        |

|             |   |                |
|-------------|---|----------------|
| 23875-24288 | SeT4 (proteína putativa de estabilidad plasmídica similar a StbB) | Directo        |
| 24296-25567 | <i>umuC</i> (proteína de protección ante luz UV)                  | Complementario |
| 25570-26004 | <i>umuD</i> (proteína de protección ante luz UV)                  | Complementario |
| 26001-26251 | <i>dinI</i> (proteína putativa DNA-damage inducible protein DinI) | Directo        |
| 28143-28826 | SeT5 (ADN metilasa N-4/N-6 putativa)                              | Directo        |
| 30732-31154 | SeT6 (proteína putativa antirrestricción KlcA)                    | Directo        |
| 32584-33108 | <i>ssb</i> (proteína de unión a ADN monocatenario)                | Directo        |
| 33371-35416 | <i>parB</i> (proteína de partición plasmídica)                    | Directo        |
| 35474-35905 | <i>psiB</i> (proteína de inhibición de la respuesta SOS, PsiB)    | Directo        |
| 35905-36621 | <i>psiA</i> (proteína de inhibición de la respuesta SOS PsiA)     | Directo        |
| 36748-38013 | <i>ydcA</i> (transposasa putativa, similar a IS605)               | Directo        |
| 37985-38872 | <i>ardA</i> (proteína antirrestricción, ArdA)                     | Directo        |
| 39604-40035 | <i>pndC</i> (sistema toxina-antitoxina, componente tóxico PndC)   | Directo        |
| 40132-40395 | <i>ygdA</i> (proteína hipotética)                                 | Directo        |
| 40463-41362 | <i>yhgA</i> (transposasa putativa)                                | Directo        |
| 41680-41928 | <i>ygeA</i> (proteína hipotética)                                 | Complementario |
| 42506-43354 | <i>ydiA</i> (metiltransferasa putativa)                           | Directo        |
| 43446-43784 | <i>mobB</i> (relaxasa/ proteína de movilización)                  | Complementario |
| 43906-43949 | <i>oriT</i> (origen de transferencia del plásmido)                | Directo        |
| 43920       | Sitio de corte para el origen de transferencia                    |                |
| 43934-43967 | Repetido invertido de 17pb  | Directo        |
| 43974-43993 | Repetido invertido de 8pb   | Directo        |
| 44012-44341 | <i>nikA</i> (proteína del relaxoma NikA)                          | Directo        |
| 44355-47051 | <i>nikB</i> (proteína del relaxoma NikB)                          | Directo        |
| 47094-49382 | <i>trbC</i> (proteína de transferencia por conjugación TrbC)      | Complementario |
| 49378-50445 | <i>trbB</i> (proteína de transferencia por conjugación TrbB)      | Complementario |
| 50467-51672 | <i>trbA</i> (proteína de transferencia por conjugación TrbA)      | Complementario |
| 51809-51966 | <i>sok</i> (sistema toxina-antitoxina Hok/Sok), ARN antitoxina    | Directo        |
| 51825-52106 | <i>pndA</i> (sistema toxina-antitoxina, componente toxina)        | Directo        |

|             |  |                |
|-------------|--|----------------|
| 52803-53582 | <i>IS100</i> orfB (secuencia de inserción <i>IS100</i> , proteína de unión a ATP)              | Complementario |
| 53582-54601 | <i>IS100</i> orfA (secuencia de inserción <i>IS100</i> , transposasa)                          | Complementario |
| 56174-56833 | <i>excA</i> (proteína de superficie de exclusión ExcA)   | Complementario |
| 56907-59141 | <i>traY</i> (proteína de transferencia por conjugación TraY)                                   | Complementario |
| 59172-59753 | <i>traX</i> (proteína de transferencia por conjugación TraX)                                   | Complementario |
| 60183-60983 | <i>traW</i> (proteína de transferencia por conjugación TraW)                                   | Complementario |
| 60953-61564 | <i>traV</i> (proteína de transferencia por conjugación TraV)                                   | Complementario |
| 61657-63591 | <i>traU</i> (proteína de transferencia por conjugación TraU)                                   | Complementario |
| 64700-65497 | <i>traT</i> (proteína de transferencia por conjugación TraT)                                   | Complementario |
| 65481-65669 | <i>traS</i> (proteína de transferencia por conjugación TraS)                                   | Directo        |
| 65736-66137 | <i>traR</i> (proteína de transferencia por conjugación TraR)                                   | Complementario |
| 66191-66715 | <i>traQ</i> (proteína de transferencia por conjugación TraQ)                                   | Complementario |
| 66718-67419 | <i>traP</i> (proteína de transferencia por conjugación TraP)                                   | Complementario |
| 67422-68708 | <i>traO</i> (proteína de transferencia por conjugación TraO)                                   | Complementario |
| 68714-69694 | <i>traN</i> (proteína de transferencia por conjugación TraN)                                   | Complementario |
| 69708-70397 | <i>traM</i> (proteína de transferencia por conjugación TraM)                                   | Complementario |
| 70397-70741 | <i>traL</i> (proteína de transferencia por conjugación TraL)                                   | Complementario |
| 70762-74562 | <i>sogL</i> (ADN primasa, SogL)  | Complementario |
| 74616-75167 | <i>nuc</i> (endonucleasa resistente a EDTA)  | Directo        |
| 75185-75472 | <i>traK</i> (proteína de transferencia por conjugación TraK)                                   | Complementario |
| 75472-76617 | <i>traJ</i> (ATPasa del sistema de conjugación TraJ)   | Complementario |
| 76617-77432 | <i>traI</i> (proteína de transferencia por conjugación TraI)                                   | Complementario |
| 77432-77887 | <i>traH</i> (proteína de transferencia por conjugación TraH)                                   | Complementario |
| 78285-78866 | <i>traG</i> (proteína de transferencia por conjugación TraG)                                   | Complementario |
| 78929-80128 | <i>traF</i> (proteína de transferencia por conjugación TraF)                                   | Complementario |
| 80217-81038 | <i>traE</i> (proteína de transferencia por conjugación TraE)                                   | Complementario |
| 81192-82343 | <i>rci</i> (ADN recombinasa específica del <i>shufflon</i> )                                   | Complementario |
| 82327-82656 | <i>shfB</i> (proteína putativa del <i>shufflon</i> , componente B)                             | Directo        |
| 83150-84583 | <i>pilVA</i> (preadhesina del sistema de secreción tipo IV/ componente A del <i>shufflon</i> ) | Complementario |

|             |   |                |
|-------------|---|----------------|
| 84574-85254 | <i>pilU</i> (peptidasa líder del sistema de secreción tipo IV PilU)         | Complementario |
| 85215-85772 | <i>pilT</i> (transglicosilasa putativa PilT)                                | Complementario |
| 85785-86396 | <i>pilS</i> (prepilina del sistema de secreción tipo IV PilS)               | Complementario |
| 86417-87511 | <i>pilR</i> (proteína integral de membrana PilR)                            | Complementario |
| 87527-89077 | <i>pilQ</i> (proteína de unión a ATP PilQ)                                  | Complementario |
| 89091-89540 | <i>pilP</i> (proteína del <i>pilus</i> de secreción tipo IV PilP)           | Complementario |
| 89530-90822 | <i>pilO</i> (proteína accesoria del <i>pilus</i> de secreción tipo IV PilO) | Complementario |
| 90818-92497 | <i>pilN</i> (lipoproteína de transferencia por conjugación PilN)            | Complementario |
| 92514-92948 | <i>pilM</i> (proteína de transferencia por conjugación PilM)                | Complementario |
| 92951-94015 | <i>pilL</i> (lipoproteína PilL)   | Complementario |
| 94052-94639 | <i>pilK</i> (proteína del <i>pilus</i> de secreción tipo IV PilK)           | Complementario |
| 94692-95141 | <i>pilJ</i> (proteína PilJ)   | Directo        |
| 95187-95438 | <i>pilI</i> (proteína de transferencia por conjugación PilI)                | Directo        |
| 95709-96332 | <i>traD</i> (proteína de transferencia por conjugación TraD)                | Complementario |
| 96289-96969 | <i>traC</i> (proteína de transferencia por conjugación TraC)                | Complementario |
| 97226-97756 | <i>traB</i> (proteína de transferencia por conjugación TraB)                | Complementario |
| 98201-98485 | <i>traA</i> (proteína de transferencia por conjugación TraA)                | Complementario |
| 98538-98625 | ARN antisentido c4 de fagos de la familia P                                 | Directo        |

## ANEXO III: ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS *POST HOC*

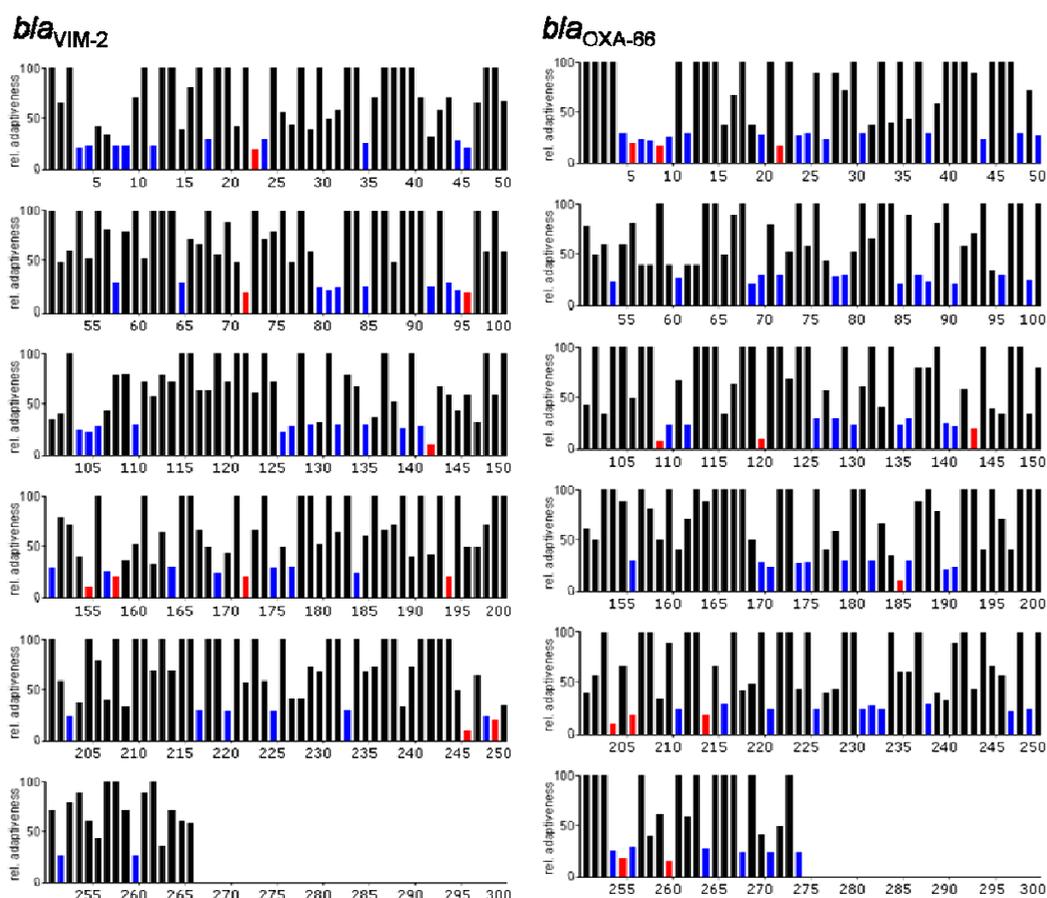
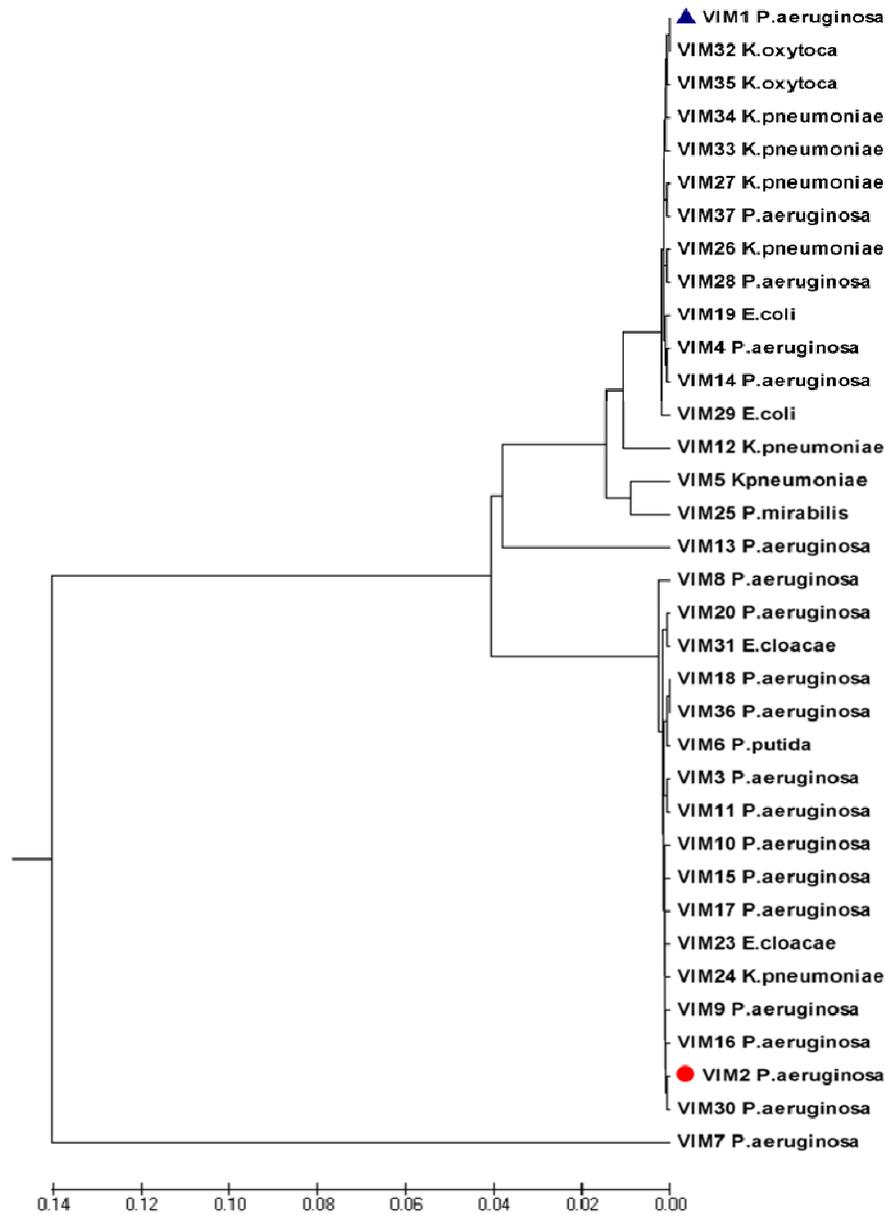


Figura A3.1, Gráficos de uso de codones para *bla*<sub>VIM-2</sub> (izquierda) y *bla*<sub>OXA-66</sub> (derecha). Se muestra la adaptabilidad relativa de las secuencias codificantes; ésta toma en cuenta el número de codones que codifican para el aminoácido respectivo. Para un microorganismo determinado y para cada aminoácido, el codón con la mayor frecuencia de uso toma el valor de 100%, y se proratea los demás aminoácidos que codifican para el mismo codón en función de dicho valor. Las barras azules representan aquellos codones con una adaptabilidad relativa menor al 30%, las barras rojas representan los codones con una adaptabilidad relativa menor al 20%. En tal sentido la secuencia codificante de *bla*<sub>OXA-66</sub> mostró 62 y 12 codones con adaptabilidad relativa menor al 30% y 20%, respectivamente; por otro lado, la secuencia codificante para *bla*<sub>VIM-2</sub> mostró 45 y 10 codones con adaptabilidades relativas menores al 30% y 20%, respectivamente, tomando como referencia la frecuencia de uso de codones de *S. Typhimurium* LT2 (Kasuzá codon usage database, <http://www.Kasuzá.or.jp/codon/>). Los histogramas fueron generados mediante el algoritmo Graphical Codon Usage Analyser (GCUA 2.0; Fuhrmann *et al.*, 2004) disponible online, aplicando la tabla de uso de codones para *S. Typhimurium* LT2 (1H<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=99287>).

A)



B)

|       | SP          |            |             |             |            |       |  |  |  |  |  |
|-------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|-------|--|--|--|--|--|
| VIM-1 | MLKVISSLLV  | YMTASVMAVA | SPLAHSGEPS  | GEYPTVNEIP  | VGEVRLYQIA | DGVWS |  |  |  |  |  |
| VIM-2 | .F.LL.K...  | .L...I..I. | ...F.VDS.   | .....S...   | .....      | ..... |  |  |  |  |  |
|       | HIATQSFDDGA | VYPSNGLIVR | DGDELLIDT   | AWGAKNTAAL  | LAEIEKQIGL | PVTRA |  |  |  |  |  |
|       | .....       | .....      | .....       | .....       | .....      | ..... |  |  |  |  |  |
|       | VSTHFHDDRV  | GGVDVLRAG  | VATYASPSTR  | RLAEAEAGNEI | PTHSLEGLSS | SGDAV |  |  |  |  |  |
|       | .....       | .....      | .....       | .....V..... | .....      | ..... |  |  |  |  |  |
|       | REGPVVELFYP | GAAHSTDNLV | VYVPSANVLY  | GGCAVHELSS  | TSAGNVADAD | LAERP |  |  |  |  |  |
|       | .....       | .....      | .....S..... | .....IY...R | .....      | ..... |  |  |  |  |  |
|       |             |            |             | ***         | *          |       |  |  |  |  |  |
|       | TSVERIQKHY  | PEAEVVIPGH | GLPGGLDLLQ  | HTANVVKAKK  | NRSVAE     |       |  |  |  |  |  |
|       | ..I....Q..  | ...QF..... | .....K      | ..T.....T   | ...V..     |       |  |  |  |  |  |

Figura A3.2 A) Relación filogenética de las enzimas pertenecientes a la familia VIM de metalo  $\beta$ -lactamasas. El dendrograma se realizó mediante el método UPGMA con el programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). Se indican las distintas variantes y el microorganismo a partir del cual fueron descritas inicialmente. Las secuencias aminoacídicas deducidas y el microorganismo a partir del cual se describieron originalmente, fueron obtenidas de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (0H<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). B) Alineamiento de las metalo  $\beta$ -lactamasas VIM-1 y VIM-2; el corchete indica el péptido señal (SP) y los asteriscos marcan los cambios cercanos al sitio activo de VIM-2.

Tabla A3.1 Cálculo del costo predicho, en moléculas de ATP, de la producción de las enzimas VIM-2 y OXA-66.

| VIM-2 | Número de residuos <sup>a</sup> | Costo por aa (ATPs) <sup>b</sup> | Σ   | OXA-66 | Número de residuos | Costo por aa (ATPs) | Σ   |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|-----|--------|--------------------|---------------------|-----|
| A=Ala | 29                              | 12,5                             | 363 | A=Ala  | 22                 | 12,5                | 275 |
| C=Cis | 1                               | 24,5                             | 25  | C=Cis  | 1                  | 24,5                | 25  |
| D=Asp | 14                              | 1                                | 14  | D=Asp  | 10                 | 1                   | 10  |
| E=Glu | 16                              | 15,3                             | 245 | E=Glu  | 16                 | 15,3                | 245 |
| F=Fen | 7                               | 12,5                             | 88  | F=Fen  | 10                 | 12,5                | 125 |
| G=Gli | 23                              | 14,5                             | 334 | G=Gli  | 19                 | 14,5                | 276 |
| H=His | 9                               | 33                               | 297 | H=His  | 4                  | 33                  | 132 |
| I=Ile | 14                              | 32,3                             | 452 | I=Ile  | 18                 | 32,3                | 581 |
| K=Lis | 6                               | 18,5                             | 111 | K=Lis  | 25                 | 18,5                | 463 |
| L=Leu | 27                              | 33                               | 891 | L=Leu  | 25                 | 33                  | 825 |
| M=Met | 2                               | 18,5                             | 37  | M=Met  | 7                  | 18,5                | 130 |
| N=Asn | 7                               | 4                                | 28  | N=Asn  | 15                 | 4                   | 60  |
| P=Pro | 14                              | 12,5                             | 175 | P=Pro  | 11                 | 12,5                | 138 |
| Q=Gln | 6                               | 9,5                              | 57  | Q=Gln  | 17                 | 9,5                 | 162 |
| R=Arg | 11                              | 18,5                             | 204 | R=Arg  | 6                  | 18,5                | 111 |
| S=Ser | 24                              | 15                               | 360 | S=Ser  | 18                 | 15                  | 270 |
| T=Tre | 16                              | 6                                | 96  | T=Tre  | 16                 | 6                   | 96  |
| V=Val | 27                              | 25                               | 675 | V=Val  | 19                 | 25                  | 475 |
| W=Trp | 3                               | 78,5                             | 236 | W=Trp  | 7                  | 78,5                | 550 |
| Y=Tir | 10                              | 56,5                             | 565 | Y=Tir  | 8                  | 56,5                | 452 |

5.250

5.398

<sup>a</sup> El recuento de los residuos aminoácidos se realizó mediante el algoritmo EMBOSS Pepstats disponible *on-line* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepstats/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)).

<sup>b</sup> Valores obtenidos de Craig and Weber, 1998.

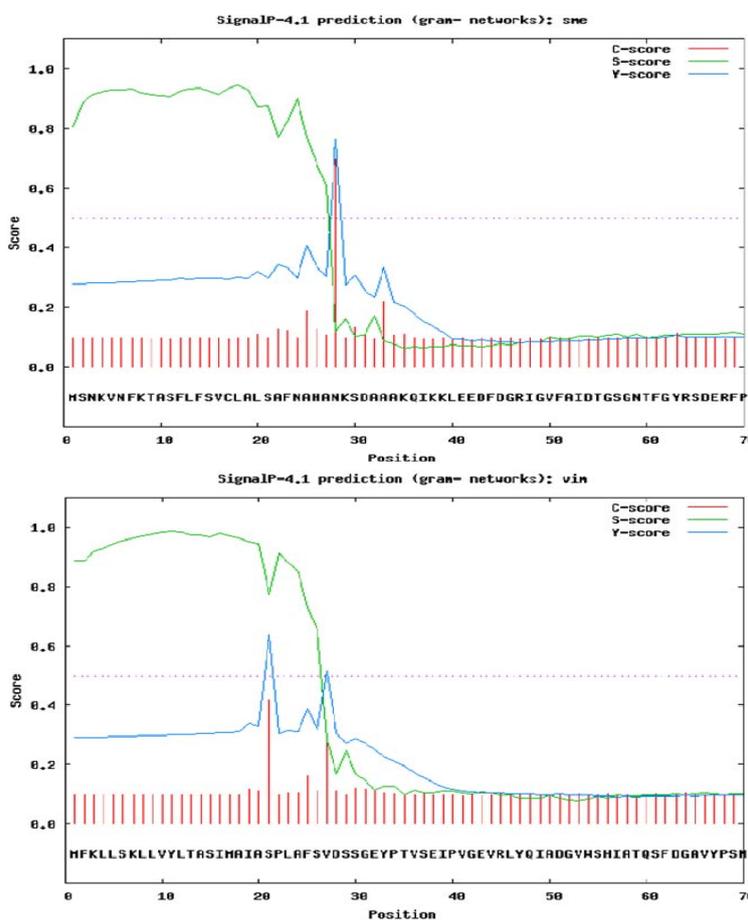


Figura A3.3 Predicción del péptido señal para SME-1 (arriba) y VIM-2 (abajo). Las curvas en verde corresponden a la región que mejor se ajusta al modelo predictor; los picos en azul junto con las barras de mayor altura indican los sitios probables de corte de las peptidasas (en otras palabras el comienzo del péptido maduro). Los gráficos fueron generados mediante el algoritmo SignalP 4.1

(2H<http://www.cbs.dtu.dk/service/s/SignalP/>).

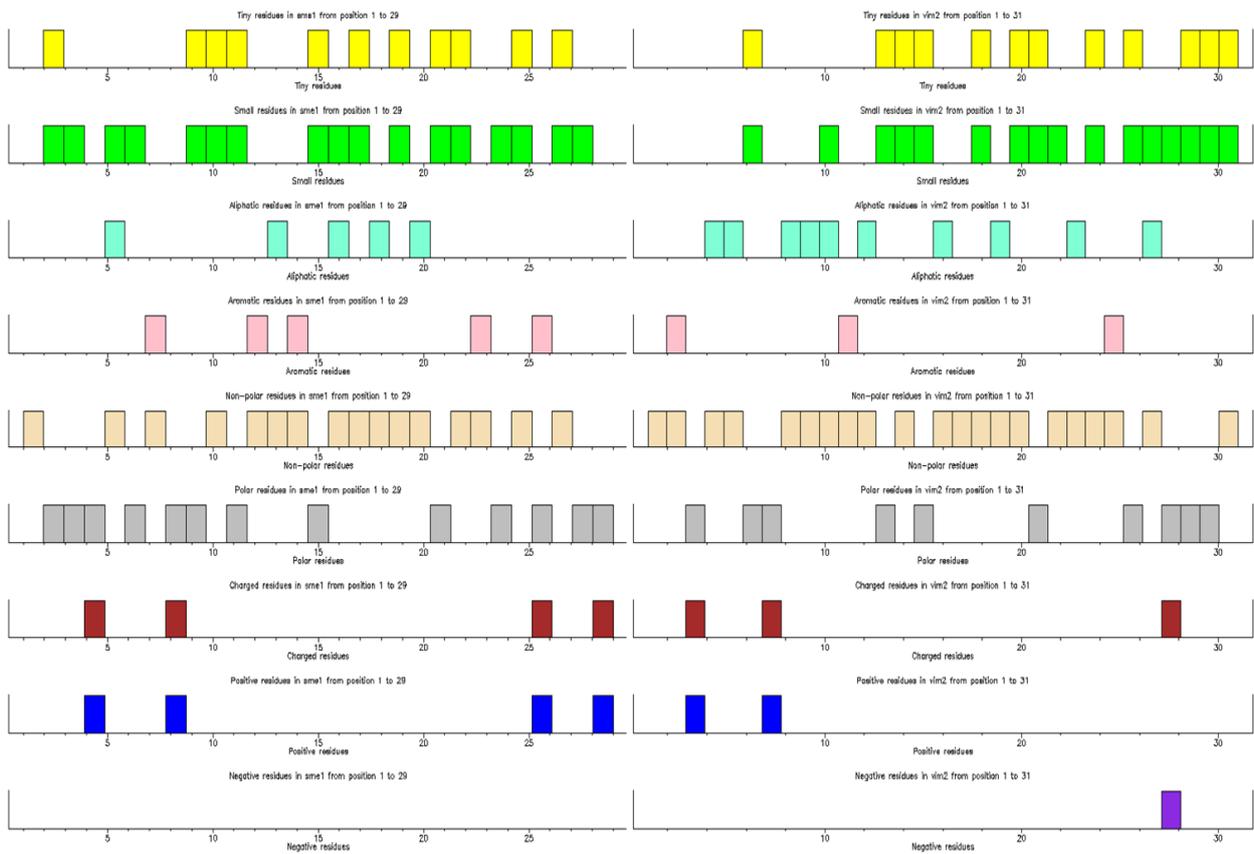


Figura A3.4 Análisis de las propiedades fisicoquímicas de los residuos aminoacídicos que componen el péptido señal de SME-1 (izquierda) y VIM-2 (derecha). Las barras en los histogramas corresponden a cada residuo y los colores hacen referencia a distintas propiedades (amarillo: residuos muy pequeños; verde: residuos pequeños; celeste: residuos alifáticos; rosa: residuos aromáticos; crema: residuos no polares; gris: residuos polares; marrón: residuos cargados; azul: residuos con carga positiva; violeta: residuos con carga negativa. Histograma generado con el algoritmo EMBOSS-Pepinfo ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepinfo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo/)).

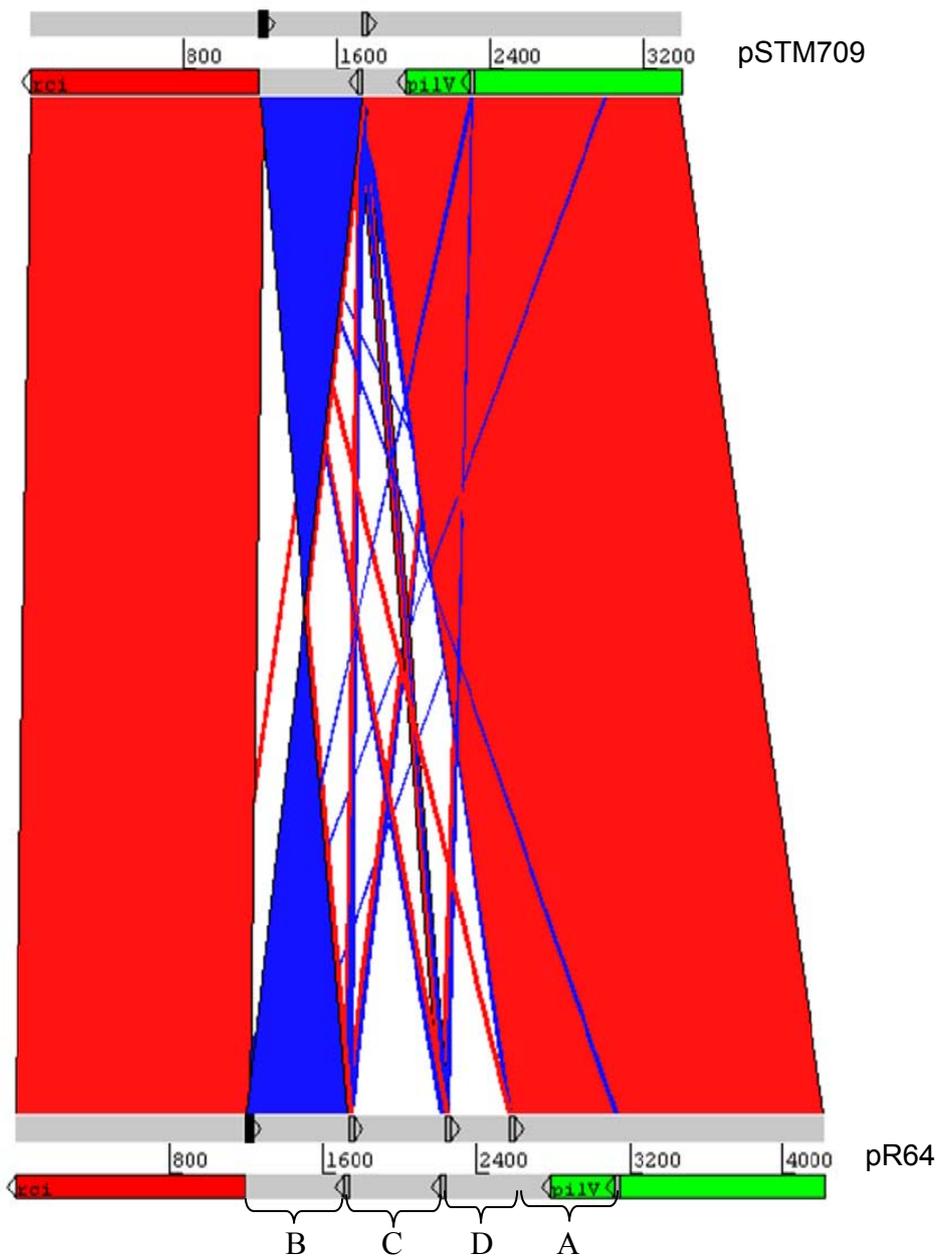


Figura A3.5 Estudio de sintenía del *shufflon* correspondiente a los plásmidos pSTM709 y R64 (N° de acceso AP005147). Las barras horizontales grises representan las dos hebras de ADN; las marcas triangulares indican las distintas secuencias *sfx*, y su orientación, reconocidas por la recombinasa específica de sitio Rci. Se aprecia la existencia de una inversión de aproximadamente 500pb entre ambos plásmidos (en azul), así como la delección de los segmentos C, y D del *shufflon* en pSTM709. La comparación de las secuencias nucleotídicas se realizó con ayuda del paquete informático Artemis Comparison Tool 11.0.0 (Carver *et al.*, 2005).

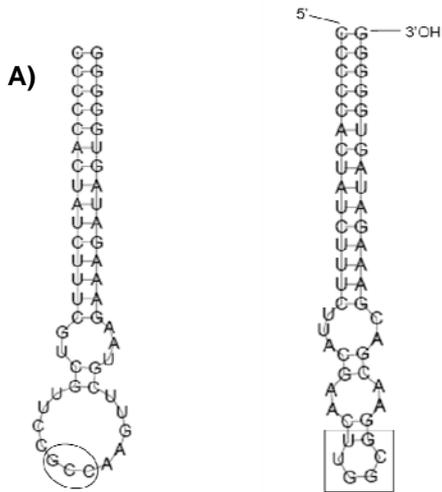


Figura A3.6 A) Predicción de plegamiento del ARN antisentido Inc (izquierda) y del extremo 5' del mRNA de RepZ (derecha) del plásmido pSTM709. El triplete necesario para la interacción entre ambas estructuras aparece señalado mediante un óvalo y en el recuadro (motivo conservado 5'-rUUGGCG-3'). Las imágenes fueron generadas mediante la aplicación RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) (Gruber *et al.*, 2008).

B) Alineamiento del ARN antisentido Inc del plásmido pSTM709 y de la cepa WT CUMC-50 descrita por Kurpiel y Hanson. C) Alineamiento del extremo 5' del mRNA de RepZ del plásmido pSTM709 y la variante WT descrita por Asano y cols.

**B)** pSTM709  
CUMC-50

```

CCCCCACTATCTTTTCGTCGTTCCGCCAAGTTCGTAAGAAAAGATAGTGGGGG
CCCCCACTATCTTTTCGTCGTTCCGCCAAGTTCGTAAGAAAAGATAGTGGGGG
*****

```

**C)** pSTM709  
pKA340-W3

```

CCCCCACAUAUCUUUCUUACGAACUUGGCGGAACGACGAAAAGAUAGUGGGGG
CCCCCACAUAUCUUUCUUACGAACUUGGCGGAACGACGAAAAGAUAGUGGGGG
*****

```



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jgar](http://www.elsevier.com/locate/jgar)



# Identification of the first *bla*<sub>CMY-2</sub> gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America

Nicolás F. Cordeiro<sup>a</sup>, Lucía Yim<sup>b</sup>, Laura Betancor<sup>a,b</sup>, Daniela Cejas<sup>c</sup>, Virginia García-Fulgueiras<sup>a</sup>, María Inés Mota<sup>a,d</sup>, Gustavo Varela<sup>a</sup>, Leonardo Anzalone<sup>e</sup>, Gabriela Algorta<sup>a,d</sup>, Gabriel Gutkind<sup>c</sup>, Juan A. Ayala<sup>f</sup>, José A. Chabalgoity<sup>b</sup>, Rafael Vignoli<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Alfredo Navarro 3051, CP: 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Alfredo Navarro 3051, CP: 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, CP: 1113 Buenos Aires, Argentina

<sup>d</sup> Laboratorio Central del Hospital Pereira Rossell – Ministerio de Salud Pública, Br. Artigas 1550, CP: 11600 Montevideo, Uruguay

<sup>e</sup> Hospital Policial, Sanidad Policial, José Batlle y Ordóñez s/n, CP: 12000 Montevideo, Uruguay

<sup>f</sup> Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa', CSIC-UAM, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 March 2013

Received in revised form 10 April 2013

Accepted 16 April 2013

#### Keywords:

Salmonella

CMY-2

Fitness

### ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics, to characterise their mechanisms of antibiotic resistance and to evaluate the possible biological cost of expressing resistance genes. Two oxyimino-cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates obtained from children with diarrhoea were characterised. The occurrence of plasmid-encoded *bla*<sub>CMY-2</sub> genes was confirmed by molecular methods and conjugation assays; transcription levels were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The genomic context of the  $\beta$ -lactamases, replicon type and addiction systems were analysed by PCR. Genomic relatedness of both isolates was studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) assays. Growth curves, motility and invasiveness assays in Caco-2 cells were performed to analyse the bacterial fitness of both isolates. Both isolates carried a *bla*<sub>CMY-2</sub>-like allele in an IncI plasmid and belonged to the same MLST sequence type (ST19); nevertheless, they showed extensive differences in their PFGE profiles and virulotypes. Isolate STM709 appeared to lack the *Salmonella* virulence plasmid and displayed less motility and invasiveness in cultured cells than isolate STM910. qRT-PCR showed that isolate STM709 had higher *bla*<sub>CMY-2</sub> mRNA levels compared with STM910. Altogether, the results suggest that a plasmid carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> could be disseminating among different clones of *S. Typhimurium*. Different levels of *bla*<sub>CMY-2</sub> mRNA could have an effect on the fitness of this micro-organism, resulting in lower invasiveness and motility.

© 2013 International Society for Chemotherapy of Infection and Cancer. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *S. enterica* serovar Enteritidis are the main serotypes responsible for human salmonellosis worldwide, causing digestive tract infection and invasive infections associated with consumption of contaminated food, especially poultry [1]. In Uruguay, *S. Typhimurium* has been one of the main causes of human salmonellosis since 1971, alternating with *S. Enteritidis* since 1995 [2,3].

Antibiotic treatment for salmonellosis is indicated for life-threatening infections in children, elderly people or immunocompromised patients, and therapeutic recommendations are usually trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), fluoroquinolones and oxyimino-cephalosporins [4].

Therapeutic options for paediatric patients are particularly reduced since resistance to SXT is variable among bacterial enteropathogens and it may even aggravate infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* [5,6]. Furthermore, paediatric fluoroquinolone usage is restricted on account of possible adverse effects [7].

On the other hand, use of oxyimino-cephalosporins has been reduced in North American countries (Mexico, USA and Canada)

\* Corresponding author. Tel.: +598 2 487 57 95; fax: +598 2 487 57 95.

E-mail address: [rvignoli@higiene.edu.uy](mailto:rvignoli@higiene.edu.uy) (R. Vignoli).

owing to the increasing occurrence of *Salmonella* spp. strains bearing *bla*<sub>CMY-2</sub> [8–10].

Until recently, the situation in South America was different on account of the absence of reports on this continent regarding *Salmonella* isolates carrying such  $\beta$ -lactamases.

In Uruguay, *S. Typhimurium* has historically remained susceptible to oxyimino-cephalosporins [11]. The first report of a human isolate of oxyimino-cephalosporin-resistant *S. Enteritidis* (CTX-M-14) was in 2012 [12], with a precedent of a TEM-144-producing *S. enterica* serovar Derby strain isolated from eggs in 2002 [13].

In contrast to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production, the presence of class C  $\beta$ -lactamases in *S. Typhimurium* has been associated with a fitness cost in terms of reduced invasive capability and lower growth rates [14].

The aims of this work were to characterise the mechanisms of resistance to oxyimino-cephalosporins, amoxicillin/clavulanic acid (AMC) and ceftaxime present in two *S. Typhimurium* isolates obtained from children with diarrhoea in Uruguay. In addition, the putative effects of expressing such resistance genes on the fitness of the isolates were evaluated by analysing their growth rate, motility and invasiveness into epithelial cells in comparison with a contemporary isolate susceptible to third-generation cephalosporins.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains

Two faecal isolates of *S. Typhimurium* (STM709 and STM910) were obtained from children with diarrhoea in two tertiary care centres in Montevideo, Uruguay, in July 2009 and September 2010, respectively. *Salmonella* Typhimurium strains SL1344 and STM23 were used as controls. SL1344 is a mouse-virulent, antibiotic-susceptible laboratory strain [14], whereas STM23 is an oxyimino-cephalosporin-susceptible clinical isolate of *S. Typhimurium* collected in Uruguay in 2009 from a case of diarrhoea.

Strains were routinely grown aerobically at 37 °C in Luria–Bertani (LB) broth (Amresco, Solon, OH) supplemented with 100 mg/L ampicillin (Sigma–Aldrich, St Louis, MO) when indicated. Serotyping was conducted at the Centro Nacional de *Salmonella* (CNS) housed in the Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay [11].

### 2.2. Antibiotic susceptibility testing and plasmidic *ampC* (*p/ampC*) detection

Antibiotic susceptibility profiles were determined using a Vitek2<sup>®</sup> Compact System (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) and results were interpreted according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [15]. Minimum inhibitory concentrations (MICs) for donor and recipient strains and transconjugants were determined by Etest (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions.

Bacterial DNA was extracted using a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). *p/ampC* alleles were detected and sequenced by multiplex PCR according to Pérez–Pérez and Hanson [16].

### 2.3. Conjugation assays and plasmid characterisation

Conjugation assays were carried out using a rifampicin-resistant *E. coli* J53-2 strain as recipient. Transconjugants were selected on MacConkey agar plates (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with rifampicin (150 mg/L) (Sigma–Aldrich) and ceftriaxone (1 mg/L) (Sigma–Aldrich) [17].

Incompatibility (Inc) groups of *ampC*-carrying plasmids were determined by PCR-based replicon typing according to Carattoli et al. using total DNA from donor strains and transconjugants as template [18].

Conjugative plasmid size was estimated by treatment with S1 nuclease (Fermentas, Life Sciences, Vilnius, Lithuania) followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as described previously [12].

Addiction systems were sought in *ampC*-bearing plasmids by PCR, as reported elsewhere [12].

The link between *bla*<sub>CMY-2</sub> and different insertion sequences such as *ISEcp1*, *IS26*, *IS903* and *ISCR1* was sought by PCR using primers previously described by Eckert et al. [19].

### 2.4. Characterisation of genomic relatedness

#### 2.4.1. Multilocus sequence typing (MLST)

MLST characterisation of strains STM709 and STM910 was conducted following the guidelines described in the *S. enterica* MLST database (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica>).

#### 2.4.2. Pulsed-field gel electrophoresis

DNA macrorestriction analysis with *Xba*I was performed by PFGE following PulseNet protocols. *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 was used as a marker [20]. Bearing in mind that only two isolates were analysed, band patterns were interpreted according to the criteria of Tenover et al. [21].

### 2.5. Virulotyping

PCR detection of genes coding for proteins secreted by type III secretion systems (*avrA*, *sopE*), *Salmonella* virulence plasmid genes (*spvC*, *pefA*), *S. Typhimurium* genomic island CS54 (*shdA*, *sivH*) and phage-encoded genes (*gogB*, *Sb41*) was performed. PCR was performed as previously described using specific primers for *invA* as an internal control [2,22–25].

### 2.6. Motility tests

Motility tests were performed as described by Yim et al. [26]. Briefly, 2  $\mu$ L of overnight cultures grown in LB broth were spotted onto the surface of an LB plate containing 0.3% agar and were incubated for 6 h at 37 °C. The diameter of the motility halo was measured after 6 h of incubation. Assays were performed in triplicate and motility was previously confirmed by phase-contrast microscopy of mid-log bacterial cultures grown in LB broth.

### 2.7. Cell invasion assays

The human colon carcinoma (Caco-2) cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Caco-2 cells were maintained in minimal essential medium with Earle's salts (Gentaur, Kampenhout, Belgium) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma–Aldrich) and 15% foetal bovine serum (PAA, Pasching, Austria) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, at up to 80% confluence. Caco-2 invasion assays were performed as described previously [26]. Briefly, log-phase bacterial cultures (supplemented with ampicillin for STM709 and STM910 when indicated) were added to the cells at a multiplicity of infection of ca. 30:1, the plates were centrifuged for 5 min at 200  $\times$  g and invasion was allowed to proceed for 1 h at 37 °C. The medium was changed to gentamicin-containing medium (100 mg/L) (Sigma–Aldrich) and was incubated for 1.5 h. Then, 20  $\mu$ L of each supernatant was plated on LB agar to verify that no viable bacteria were remaining and the cells were then washed and lysed with 0.1% Triton X-100 (Sigma–Aldrich) for bacterial release and counting. Data are expressed as the

percentage of the initial inoculum. Each isolate was tested in triplicate in two independent experiments.

### 2.8. Growth curves

Growth curves for *p/ampC*-bearing strains were performed. Briefly, overnight cultures in LB broth supplemented with 100 mg/L ampicillin were diluted 1/100-fold in pre-heated LB broth with ampicillin; dilutions were incubated at 37 °C with shaking (200 rpm). Measurements of the optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) were taken at regular intervals (30 min) until stationary growth phase. All assays were performed in triplicate.

### 2.9. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA from bacterial cultures grown to late exponential phase ( $OD_{600}$  of ca. 0.9) in LB broth supplemented with ampicillin was extracted using an RNeasy<sup>®</sup> Protect Bacteria Kit (QIAGEN). Then, 1 µg of the resulting RNA was treated with DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions and was reverse transcribed using *M-MLV* reverse transcriptase (Invitrogen) and random primers in a 20 µL reaction. Then, 2 µL of a 1/128 dilution of this reaction was used for qRT-PCR using SYBR Green (QuantiTect<sup>®</sup>; QIAGEN) in a Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Primer sequences were as follows: *icdA*-F, 5'-TGGTATCGGTGTTGATGTCCTC-3'; *icdA*-R, 5'-CATCCTGGCCG-TAAACCTGTGTG-3'; *CMY2*-F, 5'-CCGCTGCTGCACTTAGCCA-3'; and *CMY2*-R, 5'-CCCGAGTCCATTGCGGCTG-3'. The cycling programme was 15 min at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 57 °C and 30 s at 72 °C. The comparative threshold cycle ( $C_T$ ) method was used for relative mRNA quantitation [27]. Briefly, the  $C_T$  obtained for *bla<sub>CMY2</sub>* was normalised by the  $C_T$  obtained for the housekeeping gene *icdA* (isocitrate dehydrogenase) in each sample, giving the  $\Delta C_T$  ( $\Delta C_T = C_{TicdA} - C_{T<sub>CMY2</sub>}$ ) [28]. Then,  $2^{\Delta C_T}$  was calculated in each sample and plotted. Since *bla<sub>CMY2</sub>* is expressed constitutively,  $2^{\Delta C_T}$  was plotted instead of the more frequently used  $2^{\Delta \Delta C_T}$  or fold change. cDNA from isolate STM23 grown in the same conditions but without ampicillin was used as a negative control.

### 2.10. Statistical analysis

Differences in motility, growth curves and invasiveness in Caco-2 cells were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) using the Bonferroni adjustment as post hoc test (SPSS 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL). Homoscedasticity was assessed using Levene's

test of homogeneity of variances. The Welch test was used whenever data showed heteroscedasticity. Differences in *bla<sub>CMY2</sub>* mRNA levels were analysed using the Mann–Whitney *U*-test (GraphPad Prism 4.0; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). A *P*-value of <0.05 (two-tailed) was considered as statistically significant in all tests.

## 3. Results

### 3.1. Antibiotic susceptibility and plasmidic *ampC* detection

Both isolates (STM709 and STM910) showed resistance to cefotaxime, ceftazidime, ceftiofloxacin and AMC but were susceptible to cefepime, carbapenems, gentamicin, amikacin, nalidixic acid, ciprofloxacin and SXT (Table 1). On the other hand, isolate STM23 was susceptible to all antibiotics tested.

STM709 and STM910 yielded a 462 bp PCR product with primers CITMF/CITMR [16]. Further sequencing confirmed the presence of a *bla<sub>CMY2</sub>*-like gene. In both cases, *bla<sub>CMY2</sub>* was located downstream of *ISEcp1* as previously reported [29].

### 3.2. Characterisation of *bla<sub>CMY2</sub>*-encoding plasmids

Transconjugants were obtained for both isolates, designated TcSTM709 and TcSTM910, respectively. Both transconjugants showed the same resistance patterns as the donor strains (Table 1). The presence of *bla<sub>CMY2</sub>* was confirmed by PCR. Donor strains and transconjugants shared a single ca. 85 kb IncI1 plasmid (pSTM709 and pSTM910) as revealed by PFGE analysis after S1 nuclease digestion (data not shown). The search for addiction systems showed only the presence of *pndAC* in both conjugative plasmids.

### 3.3. Characterisation of genomic relatedness

Both strains (STM709 and STM910) belonged to sequence type 19 (ST19) (allelic profile 10, 7, 12, 9, 5, 9, and 2), whereas PFGE analysis showed at least eight different bands between both strains (Fig. 1).

PCR detection of virulence-related genes also yielded significant differences; although both strains harboured *avrA*, *gogB* and *shdA*, STM709 showed positive PCR results for *sivH* whereas STM910 harboured *spvC*, *pefA*, *sopE* and *Sb41* (Table 1).

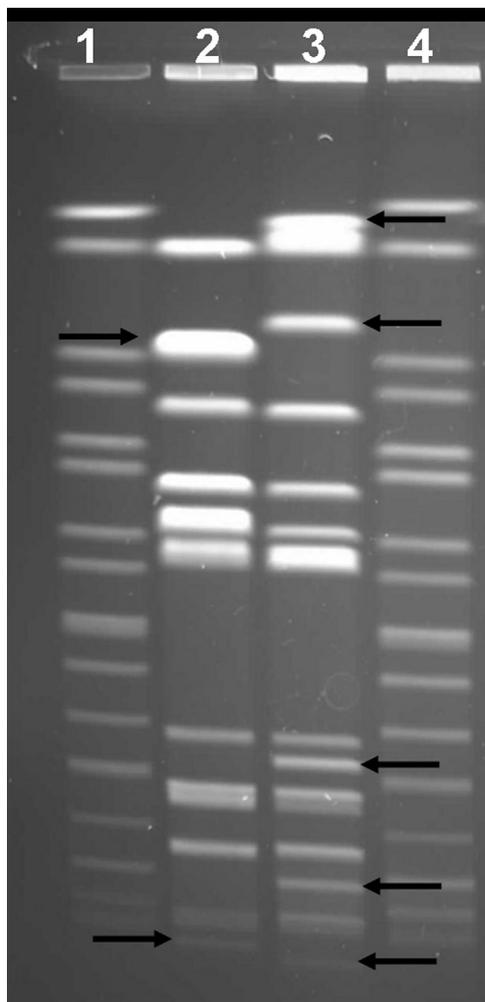
The absence of *spvC* and *pefA* in STM709 suggests that this isolate could be missing the *S. Typhimurium* virulence plasmid [30].

**Table 1**

Susceptibility profile and virulotype of strains under study.

|   | <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium strains |              | Transconjugants |              | <i>Escherichia coli</i> J53-2 | Target            |
|---|--|--------------|-----------------|--------------|-------------------------------|-------------------|
|   | STM709   | STM910       | TcSTM709        | TcSTM910     |                               |                   |
| Minimum inhibitory concentration (mg/L) |  |              |                 |              |                               |                   |
| CTX                                     | 32   | 16           | 4               | 8            | 0.125                         |                   |
| CAZ                                     | 48   | 32           | 16              | 16           | 0.38                          |                   |
| Replicon type                           | IncI1  | IncI1        | IncI1           | IncI1        | –                             |                   |
| Addiction system                        | <i>pndAC</i>   | <i>pndAC</i> | <i>pndAC</i>    | <i>pndAC</i> | –                             |                   |
| Virulotyping                            |  |              |                 |              |                               |                   |
| <i>spvC</i>                             | –  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           | Virulence plasmid |
| <i>pefA</i>                             | –  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           |                   |
| <i>avrA</i>                             | +  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           | SPI-1             |
| <i>sopE</i>                             | –  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           | SopEΦ (SPI-1)     |
| <i>sivH</i>                             | +  | –            | N/D             | N/D          | N/D                           | CS54 island       |
| <i>shdA</i>                             | +  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           |                   |
| <i>gogB</i>                             | +  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           | Gifsy-1           |
| <i>Sb41</i>                             | –  | +            | N/D             | N/D          | N/D                           | φSE20             |

CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; N/D, not determined.



**Fig. 1.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains STM709 and STM910. Lanes 1 and 4, reference strain *S. enterica* serovar Braenderup H9812; lane 2, STM709 (*bla*<sub>CMY-2</sub>); lane 3, STM910 (*bla*<sub>CMY-2</sub>). Arrows indicate differences in band patterns. Variations in band intensity were not considered.

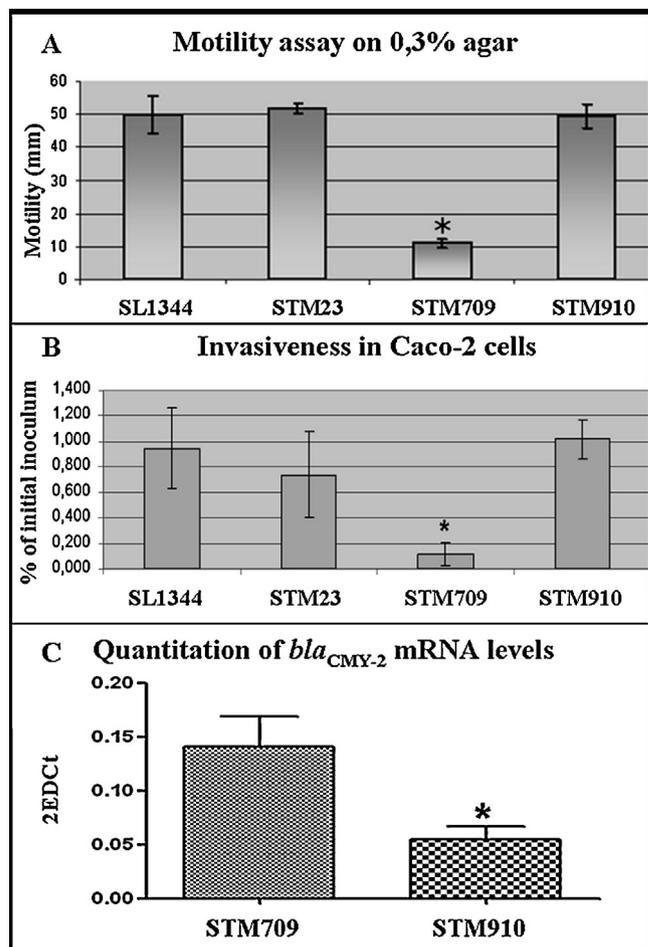
### 3.4. Motility assays and growth curves

Strain STM709 was significantly less motile than strain STM910 and reference strains SL1344 and STM23, indicated by a halo of motility ca. 80% smaller after 6 h of incubation in semisolid agar (Fig. 2A). Phase-contrast microscopy of bacterial cultures revealed an aggregated phenotype for strain STM709. Since bacterial clumping could hamper motility, strain STM709 was centrifuged and carefully re-suspended by pipetting to ensure disaggregation of possible clumps prior to plating onto semisolid agar plates. Disaggregation was confirmed by wet-mount microscopy. Motility results were the same with or without previous disaggregation.

Regarding growth curves, strains STM709 and STM910 did not show statistically significant differences (data not shown).

### 3.5. Cell invasion assays

Caco-2 invasion assays showed that strain STM709 was ca. eight and six times less invasive than reference strains SL1344 and STM23, respectively (see Fig. 2B). Strain STM910 appeared to be more invasive than both reference strains. To corroborate that clumping formation was not interfering with the invasiveness of STM709, the bacterial inoculum was centrifuged and re-suspended



**Fig. 2.** (A) Results of motility assays on 0.3% Luria-Bertani (LB) agar for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains STM709 and STM910 and control strains SL1344 and STM23. The mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments is plotted. (B) Invasiveness in Caco-2 cells. Results are expressed as percentage of the initial inoculum. The mean  $\pm$  standard deviation of two independent experiments is plotted. (C) Quantitation of *bla*<sub>CMY-2</sub> mRNA levels. Total RNA from late log-phase cultures of strains STM709 or STM910 was obtained and the levels of *bla*<sub>CMY-2</sub> transcripts were measured by quantitative real-time PCR. The mean  $\pm$  standard deviation of 2<sup>ΔCt</sup> of five replicates in two independent experiments is plotted. \*Indicates a statistically significant difference.

prior to infecting the monolayer, and bacterial disaggregation was assessed by wet-mount microscopy.

### 3.6. Quantitative real-time PCR measurement of *bla*<sub>CMY-2</sub> mRNA levels

Since isolate STM709 showed reduced motility and cell invasiveness while displaying slightly higher MICs to  $\beta$ -lactam antibiotics compared with isolate STM910, and based on background data reporting reduced fitness in *S. Typhimurium* owing to the expression of a class C  $\beta$ -lactamase [14], we decided to evaluate the levels of *bla*<sub>CMY-2</sub> gene expression in both isolates in order to evaluate the putative biological cost of expressing this gene. In line with the previous report, qRT-PCR analysis revealed that the levels of *bla*<sub>CMY-2</sub> mRNA were 2.6 times higher in isolate STM709 compared with isolate STM910 (Fig. 2C), this difference being statistically significant.

## 4. Discussion

Antibiotic susceptibility patterns of *S. enterica* are changing in Uruguay and probably in South America as well. In this sense, we

previously reported the first clinical isolate of *S. Enteritidis* carrying *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in this continent [12].

Considering that *S. Typhimurium* lacks *ampC* in its chromosome [14] as well as the lack of reports of *p/ampC*-bearing *Salmonella* isolates in South America, such isolates could be misidentified in those clinical laboratories in South America lacking highly discriminative identification capabilities on account of an 'atypical' susceptibility pattern.

From the analysis of two different clinical isolates, results suggest that a plasmid carrying *bla*<sub>CMY-2</sub> could be disseminating among different clones of *S. Typhimurium*. Although both isolates belonged to ST19, important differences were found regarding their PFGE patterns and virulence-associated genes, suggesting that both isolates have dissimilar genetic backgrounds. Such differences could be due to the presence/absence of the virulence plasmid, the genetic structure of genomic island CS54 and the presence of phages SopEΦ and φST64b.

Strain STM709 (isolated in 2009) appears to lack the *Salmonella* virulence plasmid as well as SopEΦ and ST64b prophages; besides, it also displays less motility and is less invasive than *S. Typhimurium* strains SL1344 and STM23. Formation of bacterial clumps by STM709 could impair its motility as well as altering the interaction with host cell receptors, thus affecting its invasive capability. Nevertheless no differences were found in motility or invasiveness between the bacterial inocula with or without disaggregation prior to the assays. The features exhibited by STM709 are in accordance with findings by Morosini et al. regarding the biological cost for *S. Typhimurium* of expressing a class C β-lactamase [14].

On the other hand, strain STM910 displayed a similar behaviour to the control strains (i.e. SL1344 and STM23). In this sense, strain STM910 (isolated in 2010) harboured the virulence plasmid as well as the SopEΦ and ST64b prophages, displayed a motile phenotype as well as good invasive capability in Caco-2 monolayers.

Further studies are required to determine whether differences in CMY-2 expression levels are due to a larger pSTM709 copy number or to the presence in strain STM709 of an additional chromosomally encoded *bla*<sub>CMY-2</sub> gene [31]. Likewise, more studies are needed to determine (i) whether dissimilar CMY-2 expression levels and/or plasmid-related factors are accountable for the loss of fitness of *Salmonella Typhimurium* and (ii) whether pSTM709 or pSTM910 can be equally carried by clones with different degrees of virulence.

We provide here an initial insight into the nature of a *bla*<sub>CMY-2</sub>-encoding plasmid identified in South America and the different characteristics of its hosts.

In conclusion, two isolates of *S. Typhimurium* bearing *bla*<sub>CMY-2</sub> in an Inc11 'epidemic resistance plasmid' were studied to the best of our knowledge, this is the first description of *Salmonella* strains carrying such a gene in South America. In addition, the fact that one of the studied isolates displayed a good fitness could become an emerging problem in this continent, reinforcing the relevance of maintaining active vigilance.

## Funding

This work was partially supported by grants from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Uruguay) to RV.

## Competing interests

GG is a member of Carrera del Investigador Científico (CONICET, Argentina).

## Ethical approval

Not required.

## References

- [1] Hendriksen RS, Vieira AR, Karlslose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 2011;8:887–900.
- [2] Betancor L, Pereira M, Martínez A, Giossa G, Fookes M, Flores K, et al. Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48:2413–23.
- [3] Betancor L, Schelotto F, Martínez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, et al. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1155–62.
- [4] Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* 2001;32:331–51.
- [5] Mota MI, Gadea MP, González S, González G, Pardo L, Sirok A, et al. Bacterial pathogens associated with bloody diarrhea in Uruguayan children. *Revista Argentina de Microbiología* 2010;42:114–7.
- [6] Crump JA, Medalla FM, Joyce KW, Krueger AL, Hoekstra RM, Whichard JM, et al. Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:1148–54.
- [7] Committee of Infectious Diseases. The use of systemic fluoroquinolones. *Pediatrics* 2006;118:1287–92.
- [8] Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2006;54:13–21.
- [9] Zaidi MB, Leon V, Canche C, Perez C, Zhao S, Hubert SK, et al. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*<sub>CMY-2</sub> *Salmonella Typhimurium* in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007;60:398–401.
- [10] Mataseje LF, Baudry PJ, Zhanel GG, Morck DW, Read RR, Louie M, et al. Comparison of CMY-2 plasmids isolated from human, animal, and environmental *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from Canada. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010;67:387–91.
- [11] Macedo-Viñas M, Cordeiro NF, Bado I, Herrera-Leon S, Vola M, Robino L, et al. Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella Typhimurium* obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *International Journal of Infectious Diseases* 2009;13:342–8.
- [12] Bado I, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Betancor L, Caiata L, Seija V, et al. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*<sub>CTX-M-14</sub> in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012;56:2132–4.
- [13] Vignoli R, Cordeiro NF, García V, Mota MI, Betancor L, Power P, et al. New TEM-derived extended-spectrum β-lactamase and its genomic context in plasmids from *Salmonella enterica* serovar Derby isolates from Uruguay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006;50:781–4.
- [14] Morosini MI, Ayala JA, Baquero F, Martínez JL, Blázquez J. Biological cost of AmpC production for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000;44:3137–43.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. Document M100-S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [16] Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:2153–62.
- [17] Shin SY, Kwon KC, Park JW, Song JH, Ko YH, Sung JY, et al. Characteristics of *aac(6′)-Ib-cr* gene in extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *Korean Journal of Laboratory Medicine* 2009;29:541–50.
- [18] Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* 2005;63:219–28.
- [19] Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006;57:14–23.
- [20] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases* 2001;7:382–9.
- [21] Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33:2233–9.
- [22] Pasmans F, Van Immerseel F, Heyndrickx M, Martel A, Godard C, Wildemaue C, et al. Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium variant Copenhagen phage type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. *Infection and Immunity* 2003;71:6068–74.

- [23] Betancor L, Yim L, Fookes M, Martinez A, Thomson NR, Ivens A, et al. Genomic and phenotypic variation in epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates. *BMC Microbiology* 2009;9:237.
- [24] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environment Microbiology* 2003;69:290–6.
- [25] Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A, et al. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infection and Immunity* 2003;71:629–40.
- [26] Yim L, Betancor L, Martínez A, Bryant C, Maskell D, Chabalgoity JA. Naturally occurring motility-defective mutants of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated preferentially from nonhuman rather than human sources. *Applied and Environment Microbiology* 2011;77:7740–8.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [28] Cummings LA, Wilkerson WD, Bergsbaken T, Cookson BT. In vivo, *flhC* expression by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted. *Molecular Microbiology* 2006;61:795–809.
- [29] Mata C, Miró E, Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, Toleman M, Walsh TR, et al. Plasmid typing and genetic context of AmpC  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae lacking inducible chromosomal *ampC* genes: findings from a Spanish hospital 1999–2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012;67:115–22.
- [30] Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology* 2006;112:1–10.
- [31] Shahada F, Sekizuka T, Kuroda M, Kusumoto M, Ohishi D, Matsumoto A, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase gene located on a multi-drug resistance genomic island. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4114–21.